農業試驗所特刊第149號

「近年來我國重大作物病害之發生及其診斷、監測與防治」研討會專刊

蔡志濃、陳金枝、蔡佳欣、安寶貞 主編

近年來我國重大作物病害之發生及其診斷・監測與防治

—研討會專刊—

蔡志濃、陳金枝
蔡佳欣、安寶貞 主編

行政院農業委員會農業試驗所 編印

中華民國九十九年十二月

「近年來我國重大作物病害之發生及其診斷、監測與防治」研討會專刊

主　　編：蔡志濃、陳金枝、蔡佳欣、安寶貞

主辦單位：行政院農業委員會農業試驗所

行政院農業委員會農業試驗所　編印

中華民國九十九年十二月

Proceedings of Symposium on the Occurrence of Important Diseases in Taiwan in Recent Year and Development of Disease Diagnosis, Monitoring and Control

Symposium held at Taiwan Agricultural Research Institute
Council of Agriculture, Executive Yuan, Taiwan, ROC
October, 2010

Edited by
J. N. Tsai, C. C. Chen, C. H. Tsai, and P. J. Ann

Published by
Taiwan Agricultural Research Institute

December, 2010

「近年來我國重大作物病害之發生及其診斷、監測與防治」研討會議程

時　　間：99 年 10 月 14 日星期四

地　　點：行政院農業委員會農業試驗所科技服務大樓三樓國際會議廳

主辦單位：行政院農業委員會農業試驗所

時　間	議　　題	主持人與講者
08:30～09:10	報　　到	
09:10～09:30	長官致詞	陳駿季所長
09:30～10:00	拍團體照及休息	
第一節		高清文所長
10:00～10:30	重大作物病害之防治策略與執行情形及未來展望	張瑞璋組長
10:30～11:00	重大植物病害之認定及其因應措施	黃鴻章博士
第二節		柯文雄教授
11:00～11:25	柑桔黃龍病之研究與健康管理	蘇鴻基教授
11:25～11:50	近年來國內植物寄生性線蟲之發生與防治	蔡東纂主任
11:50～13:00	午餐時間	
第三節		黃德昌場長
13:00～13:25	梨葉緣焦枯病	蘇秋竹副研究員
13:25～13:50	利用產期調控與田間排水以管理茭白基腐病	黃晉興助理研究員
13:50～14:15	近年來我國新浮現之重大疫病	安寶貞組長
14:15～14:40	褐根病之發生、診斷鑑定及防治	蔡志濃副研究員
14:40～15:00	休　　息	
第四節		張瑞璋組長
15:00～15:25	洋香瓜黑點根腐病的發生與嫁接防治	林益昇主任
15:25～15:50	瓜類細菌性果斑病：病原菌檢測與病害管理	曾國欽教授
15:50～16:15	台灣中南部瓜類作物與粉蝨中雙生病毒之監測與其基因體變異性分析	胡仲祺副教授
16:15～16:40	番椒病毒病害之發生與調查	鄭櫻慧副研究員
第五節		陳駿季所長、蘇鴻基教授、張瑞璋組長、高清文所長、黃德昌場長、曾國欽教授、蔡東纂主任、林益昇教授、胡仲祺教授、安寶貞組長
16:40～17:05	綜合討論	

目　錄

序 iii

重大作物病害之防治策略與執行情形及未來展望
.... 張瑞璋、邱安隆、徐孟豪、顏辰鳳 1

重大植物病害之認定及其因應措施
.... 黃鴻章、謝廷芳 21

柑桔黃龍病之研究與健康管理
.... 蘇鴻基、蔡佳欣、馮雅智、洪挺軒 33

近年來國內植物寄生性線蟲之發生與防治
.... 蔡東纂 63

梨葉緣焦枯病
.... 蘇秋竹、馮鈞育、高清文、曾國欽、徐世典 83

利用產期調控與田間排水以管理茭白基腐病
.... 黃晉興、林益昇、安寶貞 109

近年來我國新浮現之重大疫病
.... 安寶貞、劉瑞芬、蔡志濃 127

褐根病之發生、診斷鑑定及防治
.... 蔡志濃、安寶貞、謝文瑞 147

洋香瓜黑點根腐病的發生與嫁接防治
.... 林益昇、蘇俊峯 165

瓜類細菌性果斑病：病原菌檢測與病害管理
.... 曾國欽、呂昀陞、鄭安秀、黃穗昌、徐世典 193

台灣中南部瓜類作物與粉蝨中雙生病毒之監測與其基因體變異性分析
.... 廖吉彥、鄧汀欽、林鳳琪、黃莉欣、彭瑞菊
陳宗祺、賴儀瑾、陳信宏、宋明彥、胡仲祺 205

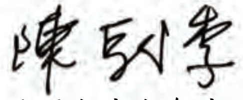
番椒病毒病害之發生與調查
.... 鄭櫻慧、陳金枝、廖吉彥、鄧汀欽、林鳳琪、詹富智 227

序

近年來全球氣候變遷，造成環境生態重大改變，尤其我國位於熱帶與亞熱帶地區，病蟲更易滋生蔓延，使得國內農業生產過程中屢見重大病害的發生，諸如馬鈴薯晚疫病、茭白筍基腐病、瓜類病毒、水稻稻熱病、林木與果樹的褐根病等，嚴重影響農民收益，並衝擊農業生產的經濟效益。為降低氣候變遷對農業生產造成的衝擊，國內防檢疫單位積極推動重大作物病害之監測宣導及整合性管理等示範工作，植物病理研究專家與學者並組成團隊投入病害病原檢測與防治技術之開發，期能及時掌握重大病害之疫情與防範病害的醞釀成災。因此，農試所藉此 115 週年所慶之際，辦理本次研討會，冀望大家共襄盛舉，對發展健康安全農業提供一份心意。

本次研討會邀請國內植物病理專家與學者擔任講者，針對近年來國內重大作物病害之發生、診斷鑑定及病害防治技術提出寶貴經驗與建言，包括柑橘黃龍病、線蟲病害、作物疫病、果樹褐根病、茭白病害、瓜類細菌與病毒病害、茄科病毒病害等，研討會並安排與會專家進行經驗交流與座談討論，期能在未來面對該類病害或相類似新病害發生時，提供借鏡與參考依據。

對於植物病害的發生，面對現況、快速尋求解決方案及防患未然，是因應未來更劇烈的氣候變遷與生態轉變之重要積極作為。展望未來，在防檢疫上的政策以及植物病理研究人員的專業配合下，將更戮力於病害發生的診斷、監測與防治研究，確切掌控疫情與提供防治措施，將病害發生所造成之農業損失降至最低，以維持農作物的健康管理與生產，確保農業之永續發展。

行政院農業委員會農業試驗所
所長

謹誌

中華民國九十九年十二月

重大作物病害之防治策略與執行情形及未來展望

張瑞璋[1]、邱安隆[1]、徐孟豪[1]、顏辰鳳[1,2]

[1]行政院農業委員會動植物防疫檢疫局

[2]聯絡作者，電子郵件信箱：cfyen@mail.baphiq.gov.tw

摘　　要

防檢局針對12種境外重要檢疫線蟲、細菌及病毒進行偵察調查，並依據防治標準作業流程，啟動相關之緊急防治措施；針對國內14種重大作物病害則進行主動監測調查，並將發布的警報透過農委會「田邊好幫手」之傳真及手機簡訊，即時傳送相關單位及農民注意防範。另為協助農民解決重大作物病害防治及安全用藥問題，針對國內重大病害如水稻稻熱病及洋香瓜病毒病等，除依據監測調查資料籲請農民注意防範外，並強化農民組訓教育、示範宣導及推動共同防治等工作。積極推動果樹、蔬菜及茶等18種作物病害整合性防治示範工作，辦理安全用藥宣導教育講習超過200場。而為防範重要病害藉由種子種苗傳播蔓延，除強制實施火鶴花特定疫病蟲害檢查外，陸續擬訂蘭花、蔬菜及果樹等7種作物之種子種苗病毒驗證作業須知，積極推廣種子種苗驗證觀念。在植物防疫人才培訓方面，防檢局舉辦文旦、水稻病蟲害、洋香瓜病毒病害、柑橘類與草莓病蟲害及栽培管理教育訓練，2010年參與人數約200人，期提升第一線植物防疫人員及農民田間生產管理、病蟲害診斷鑑定、防治及用藥能力。為強化作物病害監測及防治體系，未來應在現有的基礎與成果上，順應國際趨勢的發展，縝密規劃作物病害施政重點策略，持續改善各項防疫缺失並提升相關防疫技術，加強國際疫情資訊蒐集，及適時增修訂相關法規，以落實安全農業措施，確保農業之永續發展與農產品的衛生安全及消費者的健康。

關鍵詞：防治策略、偵察調查、監測調查、有害生物整合性管理、種子種苗驗證

緒　言

作物病害的發生與寄主及環境因子關係密切，尤其受到溫度與溼度的影響甚大，加以近來極端氣候發生頻繁，因應氣候變遷已成為當前農業政策調適之趨勢，在全球暖化的衝擊下，作物病害的發生時期、受害程度及分布範圍是否隨之改變，進而影響防治策略與成本，實有待觀察與探討[7]。另，一旦極端氣候事件逐漸成為常態，如連續豪大雨造成藥劑防治成效不彰，而颱風過後天氣放晴，田間作物微氣象經常持續高溫高溼，導致植物病原菌容易滋生蔓延[10]。有鑑於「早期發現，早期治療」是作物病害防治的基本觀念，行政院農業委員會動植物防疫檢疫局(以下簡稱防檢局)爰積極強化植物疫情的監測與管理，尤其在監測預警方面，期望在作物病害尚未大發生前，即將田間疫情資訊迅速傳送農民參考應用，以爭取病害防治管理時間。因應重大作物病害的發生，未來應改善作物栽培管理技術、落實病害共同防治及輔導栽種健康種苗，依據病害發生種類並配合氣候條件，適時協助農民採取適當、有效的防治措施，降低作物受害程度，並確保農產品品質及產量。

重大作物病害之防治策略

我國自2002年加入世界貿易組織(WTO)後，有害生物隨著農產品傳入我國的風險有增無減，入侵之有害生物不僅影響國內農產品品質及產量，亦危及我國植物有害生物非疫區或低密度流行區地位的維持及出口市場之光景。另國內植物有害生物種類超過300種，若未加適當防治，每年造成的損失可達300百億元以上。為防範植物有害生物入侵、傳播、蔓延及危害，並確保我國農業之生產安全，依據植物防疫檢疫法及國際規範落實推動植物防疫工作是當前施政的必要措施[4]。防檢局施政三大目標包括：一、健全農業防疫檢疫網，確保農產品衛生安全；二、發展農業防疫檢疫功能，強化產學資源整合；三、加強國際農業防疫檢疫合作，開拓農業發展空間[5]。因此，重大作物病害防治策略除了健全國內病害之監測、預警、診斷及通

報體系外，針對境外重要病害則實施偵察調查並進行圍堵、撲滅；加強重大作物病害非農藥防治資材及技術之開發，落實推動符合經濟效益及安全規定的作物病害整合性防治管理技術，建立植物種子種苗病害驗證制度，提升加強用藥安全的監控與管理，並持續增修訂相關法規，依據法規落實推動相關防疫措施，將作物病害之損失減至最輕；另加強國際疫情的蒐集，爭取國際防疫技術合作空間，以維護農業生產安全，進而提供國人衛生與安全之農產品，達到維護國民消費健康的最終目標。

重大作物病害之推動執行情形

一、境外重要病害之偵察調查及緊急防治

防檢局委請大專院校及香蕉研究所，針對重要檢疫線蟲（如黃金線蟲、稻莖線蟲、莖線蟲、穿孔線蟲、大豆包囊線蟲、馬鈴薯腐敗線蟲）、李痘病毒、西瓜嵌紋病毒、蘭花斑點病毒、香蕉細菌性萎凋病、香蕉條紋病毒及香蕉花苞嵌紋病毒進行偵察調查，期能早期發現，迅速處理，有效防止境外檢疫有害生物入侵，進而避免其擴散蔓延，偵察結果均登錄於植物疫情管理資訊網，迄今均未於田間發現前揭病害立足[15]。

為降低國內新發現有害生物對作物生產所造成的衝擊，並確保我國為國際重要檢疫有害生物之非疫區，針對重大境外作物有害生物，農委會於2008年10月9日依植物防疫檢疫法第8條規定公告「中華民國應施防疫之特定疫病蟲害種類」，一旦發現公告之有害生物，立即採取定界調查、監測及施行以防堵或撲滅的緊急防治措施，防檢局並依據相關法規研擬防治標準作業流程，未來將依據該流程，評估有害生物之危害風險及分布範圍，啟動相關之防治措施。

二、國內重大作物病害之監測調查及共同防治措施

防檢局為有效掌控國內重大作物有害生物疫情，委請農委會所屬各試驗改良場所就全國性或區域性作物有害生物進行主動監測調查，定期監控

作物病害發生情形，並將發布的警報傳送農委會「田邊好幫手」資訊傳送系統，透過傳真及簡訊通知相關單位及農民，呼籲其提高警覺，注意防範，減少作物損失。另針對水稻稻熱病、洋香瓜病毒病等重大病害落實推動共同防治工作；強化繁殖用植物疫病蟲害檢查制度，以防範重大病害藉由種子種苗擴散蔓延，確保農產品生產安全。

(一) 重要病害監測調查及疫情傳達(14)

由農委會各區農業改良場及茶業改良場，依據農產品外銷潛力、國內重大有害生物、國內尚未普遍發生之有害生物及區域性有害生物等原則，訂定轄區病害主動監測種類清單，包括水稻稻熱病、水稻白葉枯病、洋香瓜病毒病、晚疫病、細菌性果斑病、葡萄露菌病、荔枝露疫病、蓮霧疫病、蓮霧果腐病、檬果黑斑病、茶枝枯病、茶赤葉枯病、茶髮狀病及茶餅病等14種，定期監控其發生情形，並在病害發生初期事先預警，通知各單位及農民啟動防治措施。

針對國內重大作物病害主動監測或突發性疫情，7個區域農業改良場及茶業改良場於發布警報後，均將疫情登錄於植物疫情管理資訊網，防檢局經分析研判後啟動該些警報，透過農委會「田邊好幫手」手機簡訊，適時傳送相關單位及農民注意防範如圖一。另透過農藥販賣系統建立「即時疫情監測體系」，掌握每週田間即時疫情如圖二，並傳送至台中及台南區農業改良場(以下各區域改良場皆以轄區簡稱)以及彰化縣、雲林縣及台南縣政府，請其協助宣導農民加強防範。

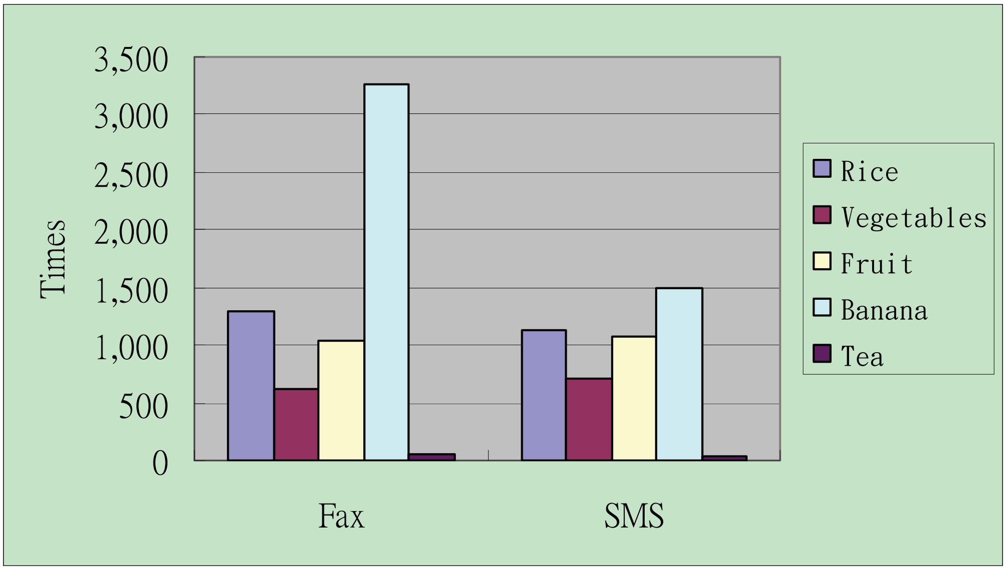
(二) 水稻稻熱病監測及共同防治

1.疫情監測

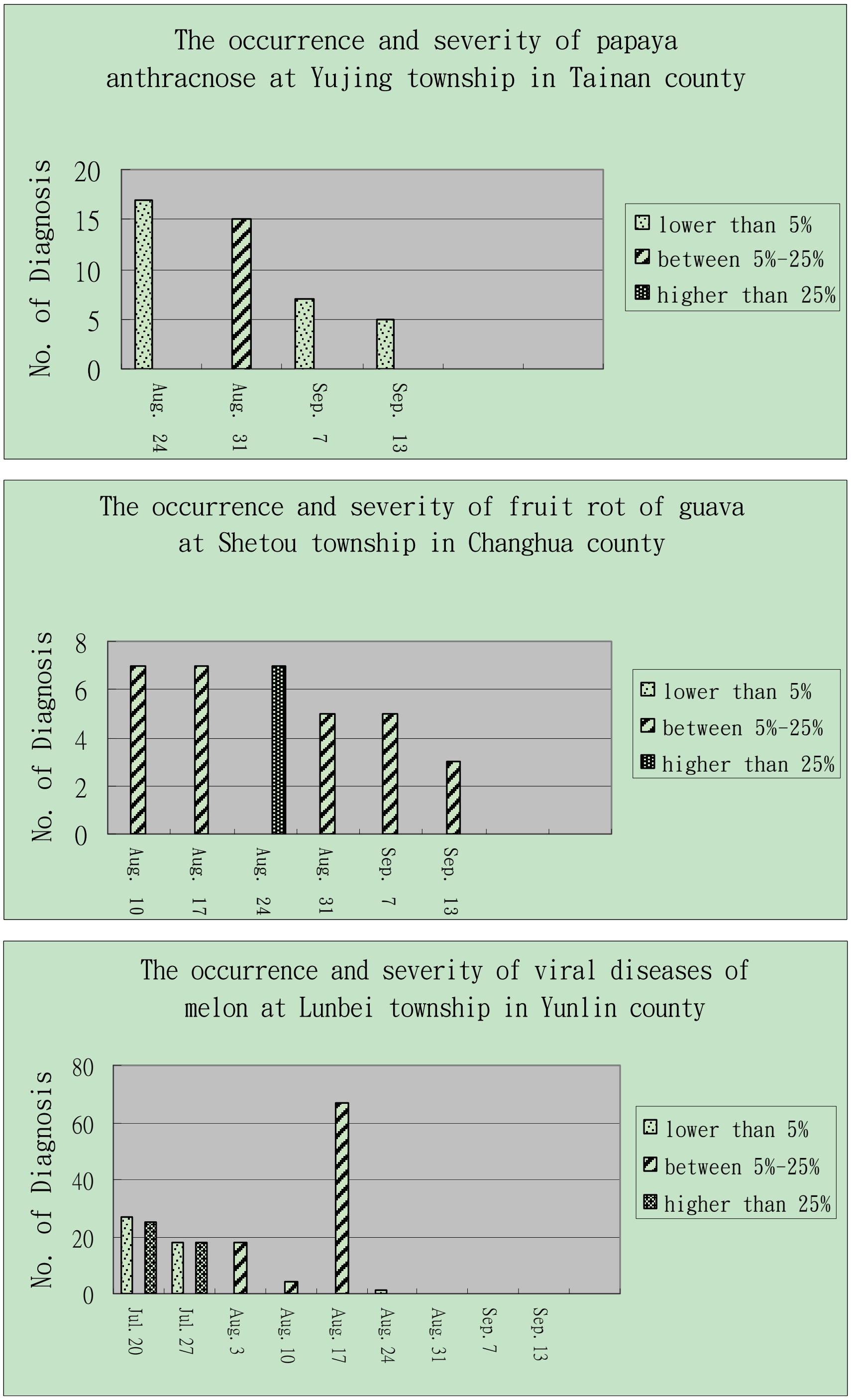
水稻稻熱病自2001年即開始進行監測，2008年起更成立全國性專案監測計畫，選定歷年病害好發之高風險地區，依據監測標準作業程序，加強大面積監測調查，期以高風險地區作為疫情指標，並導入地理資訊系統輔助疫情研判。根據2001年至2010年之調查結果，稻熱病於2003年及2007年發生較為嚴重，本年度一期作稻熱病

除高雄地區因氣候忽冷忽熱且部分田區氮肥施用過量導致疫情發生外，其餘地區根據監測資料顯示罹病度大多屬輕微程度，對水稻產量影響不顯著，該病害在部分縣市之空間分布如圖三。

防檢局及各區域改良場依據監測資料，於2001年至2010年7月共發布48則警報，2010年8月及9月因氣候不穩定，高低溫交替加上午後經常大雨，彰化、南投、雲林、嘉義、台南及台東地區水稻均傳出稻熱病疫情，台南場及台東場於8月至9月間陸續發布2則警報，並即時傳送相關單位及農民注意防範。另為提升病害調查人員之專業技能，防檢局自2008年至2010年共辦理6次疫情監測教育訓練，由相關專家學者指導稻熱病監測及防治工作之實務經驗如圖四。

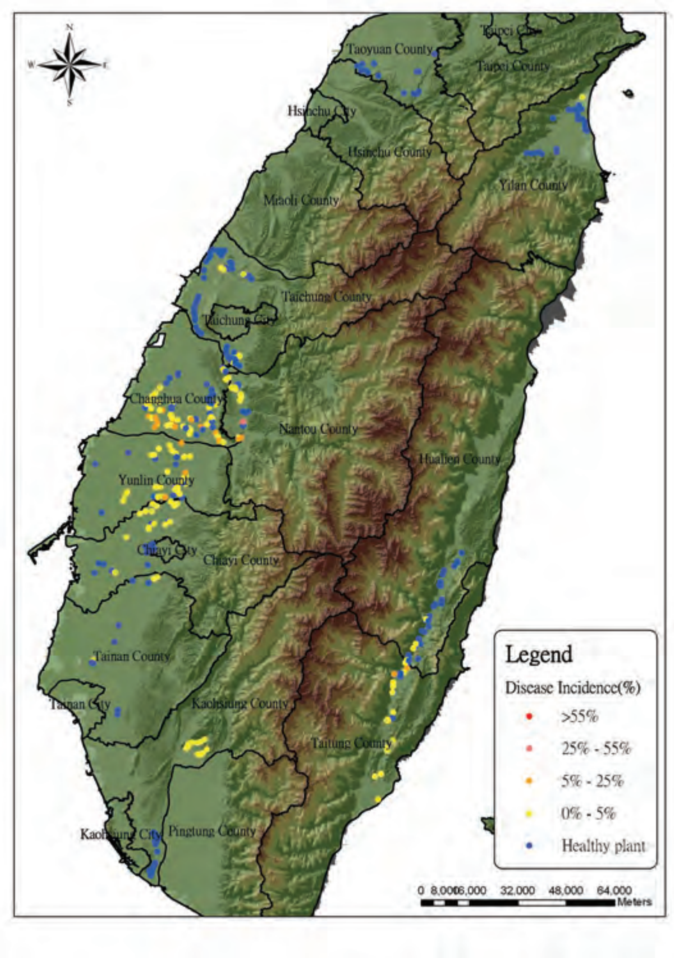


圖一、2010 年重大作物病害警報透過傳真及簡訊傳送之分析統計圖。
Fig. 1. The statistic and analysis of important crop disease alerts issued via the agricultural communication platform “Farmer`s Good Hands” by using facsimile or Short Message Service（SMS）in 2010.



圖二、2010年7月至9月之重大作物病害每週田間即時疫情。

Fig. 2. Weekly reports of important crop diseases occurred from July to September in 2010.



圖三、2010 年 3 月至 5 月水稻稻熱病空間分布圖。

Fig. 3. The spatial distribution of rice blast detected from March to May in 2010.

圖四、田間實地傳授稻熱病監測及防治工作之實務經驗。

Fig. 4. Hands-on activity in rice field to demonstrate how to monitor and manage the rice blast.

2.疫情管理

另為有效降低水稻病蟲害所造成的損失，自2001年起每年均由防檢局、各縣市政府、鄉鎮公所、農會等單位共同編列經費辦理病蟲害共同防治工作，防檢局每年補助各縣市政府約20,000千元，期能有效控制其發生蔓延及危害，減少稻作損失及保障農民收益。相關疫情管理工作包括加強疫情收集、農民組訓教育、示範宣導、補助地方政府購買防治資材、推動共同防治、防治成效調查等，茲簡要分述如下：

(1)稻農教育

於各實施地區辦理水稻栽培管理及防治技術講習，使稻農認知植物保護技術及安全用藥之重要性，並加強其對疫病蟲害鑑別能力，進而能適時、適藥、適量及適位實施藥劑防治，並協助農委會農糧署辦理「建立稻米生產安全管理體系計畫」，2010年防檢局協調農會舉辦55場工作說明會及安全用藥宣導會。

(2)推廣共同防治

臺灣地區水稻病蟲害防治工作，為各級政府植物防疫經常性施政業務，防檢局每年均參照該地區歷年疫病蟲害發生情形、水稻育苗中心及稻米產銷專業區分布，成立計畫補助地方政府，執行稻種消毒工作，生產健康秧苗以奠定水稻生產基礎，推動水稻重要病蟲害共同防治，有效提高整體防治效率。經統計每年稻種消毒約計辦理15萬公頃，水稻病蟲害共同防治10萬公頃，經統計每年約可降低稻農6%以上危害損失[(1)]。

(3)藥劑共同採購

地方政府依據該地區歷年疫病蟲害發生情形，參考植物保護手冊推薦使用之藥劑及使用方法，選擇水稻病蟲害防治效果最佳之藥劑，辦理藥劑共同採購，降低農民水稻病蟲害防治成本，提高防治效率。

(4)防治成效調查與檢討

防檢局於稻熱病發病期間，每週主動詢問各區農改場及縣市政府之轄區疫情現況及處理情形，必要時立刻派員前往現勘。另各縣市政府及區域疫情監測中心主動回報稻熱病疫情及輿情，並說明處理情形，防檢局經評估若疫情未趨緩和或有擴大蔓延趨勢，將立刻請各縣市政府啟動緊急防治工作。

(三)洋香瓜病毒病監測及防治情形

1.發生背景

洋香瓜為台南地區冬季裡作重要作物，主要產區包括台南市安南區、台南縣東山、七股、將軍及佳里等地區。2006年迄今每年均遭受病毒病不同程度之危害，主要流行的病毒包括胡瓜嵌紋病毒、木瓜輪點病毒-西瓜系統、西瓜銀斑病毒、南瓜捲葉病毒、退綠黃化病毒等5種，該等病毒主要藉由蚜蟲及薊馬等媒介昆蟲傳播，人為摘心整蔓亦會將病毒傳播至健康植株，一般洋香瓜田受害之罹病率可達3成以上，嚴重受害田甚至高達9成(13)。

2.疫情監測

2006年台南地區發生洋香瓜病毒病危害，造成農民嚴重損失，經診斷鑑定確認，該次疫情主要由薊馬及蚜蟲媒介傳播之西瓜銀斑病毒及木瓜輪點病毒—西瓜系統所引起。為避免洋香瓜病毒病再次發生流行，造成農民重大損失，防檢局自2007年起即聯合農業試驗所、農業藥物毒物試驗所、台南場、中興大學及亞洲大學專家組成監測團隊，共同執行病毒病害與媒介昆蟲密度及其帶病毒率監測。除定期監測、填報調查資料外，遇有即時疫情，則請接獲通報單位立即回報防檢局，並經試驗改良場所研判後，適時啟動防治措施(16)。另亦委託專家著手進行媒介昆蟲抗藥性監測，以了解抗藥性媒介昆蟲田間分布情形，及時調整防治用藥資訊。

2008年洋香瓜病毒病捲土重來，檢討該疫情大發生之原因，除流行的病毒變成由粉蝨媒介傳播之南瓜捲葉病毒外，主要尚包括未

確實執行清園、未杜絕人為或機械傳播、瓜苗防蟲保護措施不足、未落實共同防治等因素[3]。

3.疫情管理

針對過去洋香瓜病毒病防治缺失，防檢局結合台南場、台南縣（市）政府共同辦理洋香瓜病毒病整合性防治技術示範推廣，推動農民實施共同防治，以有效控制疫情。除持續進行病毒及媒介昆蟲監測外，於洋香瓜栽植期間，每週派員會同學者專家及縣市政府等人員赴現場協助農民防治工作，並藉由舉辦示範觀摩，將優質洋香瓜栽植區相關技術及經驗傳授與會者，持續提升病蟲害防治技術，然而防治工作之成敗，農民的自我管理工作將是關鍵，栽培洋香瓜之管理技術，從育苗、整地清園、本田定植、病蟲害防治、摘心整蔓乃至於採果清園，每項工作都要謹慎確實，另配合選種健康種子種苗及實行共同防治媒介昆蟲，才能有效防止病毒病的發生[13]。

三、整合性防治技術之研發與推廣

防檢局在推動作物有害生物整合性管理（Integrated pest management），係以符合經濟成本並結合各種不同的防治措施，壓制作物病蟲害的數量在經濟危害水平之下，以獲得最大的效益。在推動的過程中所遭遇的瓶頸包括：(一)未有效整合病蟲害防治技術，(二)過於依賴速效性的化學藥劑，(三)未依規定使用化學藥劑等。針對上述所遭遇的瓶頸，首先須整合各種防治方法，包括透過建立清園觀念及推動合理化用藥等措施[8]，運用生物防治、物理防治、化學防治及田間管理等技術[2]，藉以研發省時省力省成本的田間操作程序，並提供農民最經濟有效的整合性防治技術。為改善上列瓶頸，其相關規劃包括：(一)進行產官學計畫研發能量整合，建立作物疫病蟲害整合性管理模式與作業流程，另盤點研發成果對技術缺口予以補強，並經田間試驗操作予以檢討改進，俾求該管理模式完善符合農民之需求；(二)舉辦整合性管理講習及田間觀摩，編印作物病蟲害整合性管理行事曆，宣導農民正確的防治方法。

目前防檢局針對作物病蟲害整合性防治之推動工作如下：(一)作物病蟲害整合性管理技術補強：先請農委會所屬試驗研究機關進行該等技術之開發，如因人力、時間或專業性不足時，由防檢局邀請大專院校協助進行開發該等技術。(二)彙編作物病蟲害整合性管理摺頁或手冊：選定洋香瓜、草莓、檬果、葡萄、香蕉、印度棗、梨、荔枝、蓮霧、鳳梨釋迦、番荔枝、木瓜、文旦、茶、柑橘、山藥、青蔥及小葉菜類等18種作物進行作物病蟲害整合性管理，另請中興大學農業推廣中心協助彙整並編製成冊供農民參考。(三)辦理田間試驗：請農委會7個農業改良場及香蕉研究所協助辦理作物病蟲害整合性管理田間試驗及成果示範觀摩會，以提供給農友參考使用。(四)辦理教育宣導：由農委會所屬試驗研究機關、地方政府及防檢局分別舉辦作物病蟲害整合性管理講習會，宣導農民正確的防治方法。以防治洋香瓜病毒病為例，2009年防檢局與台南場、台南縣市政府及相關農會共同辦理整合性防治技術示範推廣，有效控制台南地區洋香瓜病毒病發生率在10％以下，提高台南地區農民收益約6千萬元。另苗栗場推動草莓病蟲害整合性管理工作，運用留苗母株進行走莖檢測，避免青枯病之感染危害，加以搭建簡易遮雨設施可減少炭疽病的發生，上列兩種措施均未利用農藥進行病害防治，有效減少農藥施用量[9]，並於2010年9月辦理田間示範觀摩會，深受農民好評。

四、非農藥防治技術之研發與應用

非農藥防治技術是發展高優質高安全有機農產品的主要支柱，防檢局結合產官學研的力量，全力推動非農藥防治(含生物農藥)技術的研發、推廣及商品化等工作，協助推動有機農業的發展，加強我國農業的國際競爭力。依美國市調公司(Business communication company)研究顯示，2009至2014年全球農藥市場將由約430億美元擴大至510億美元，而生物農藥市場則由16億美元成長至33億美元，惟產品仍以同質性較高的蘇力菌為主[17]。在台灣已登記且實際在經營生物農藥的公司有4家，產品列入植物保護手冊上者為百泰公司的純白鏈黴菌素及光華公司的枯草桿菌，另沅渼及福壽公司均有

產品在登記上市中。目前登記生物農藥證有32張，分別是枯草桿菌9張、蘇力菌22張及純白鏈黴菌1張。

國內作物病害非農藥防治資材研發尚在起步中，主要成果包括植物保護製劑配方之研發(如植物源資材及天然植物皂素等)、土壤添加物及天然植物保護製劑等，田間成功防治病害之案例如應用S-H混合物防治西瓜蔓割病[11]及利用亞磷酸防治作物疫病[18]。以往能夠上市之生物農藥商品有限，最主要原因為研究人員須獨自完成開發、量產、應用配方及田間病蟲草害防治測試等研究工作，惟其專長無法遍及各領域，且其試驗設備亦有不足，極需尋求合作及外援資助；加上生物農藥及生物防治從種原開發至產品商品化須時甚久，研發經費亦不易尋求長期資助；此外，生物農藥工廠的設廠標準大部分係修改自化學農藥工廠的標準，並進行審查，造成生物農藥工廠設立困難。有鑑於此，防檢局爰結合各領域之研究人員，擬定產品目標，訂定優先順序，集中資源，並分序在一定時間內完成商品化，另重新檢視修訂生物農藥工廠設廠法規，俾利生物農藥及生物防治產業化。2010年防檢局已委請台灣經濟研究院針對生物農藥研發成果進行成果盤點及分析，藉由盤點過去的研發成果，期發現技術缺口及登記要件等，並檢視於短期內可以登記之研發成果，列為優先支持對象，逐年檢討工作推動之目標。而對已成熟的研發成果除優先培植外，擬再配合農糧署的產業政策，組成研發團隊，依照成功案例模式，積極投入所需之相關資源，協助有機安全農業的發展。未來防檢局仍持續將上列相關技術納入作物病害整合性管理之體系，讓農民擁有一套真正可用的有害生物防治技術，以降低農藥使用量與重大病害的發生及蔓延。

五、作物種子種苗病害驗證制度執行情形

種子種苗乃作物栽培之根本，健康種子種苗能保證作物初期正常生長，藉由減少田間感染源而有效延緩或減輕後續栽培可能發生的病害，因此種子種苗病害驗證成為關鍵性的病害管理策略[6]。為防範重要之檢疫病毒、線蟲、細菌或真菌性病害藉由種子種苗等繁殖用資材傳播蔓延，防檢局於2000年5月依據「植物防疫檢疫法」第8條及第9條規定，公告火鶴花為

實施特定疫病蟲害檢查之植物種類，實施強制性種苗檢查制度。另對於國內已存在之重要非檢疫病害，亦於2002年3月公告「種苗疫病蟲害驗證輔導要點」並於2003年6月修正，陸續擬訂蝴蝶蘭、文心蘭、綠竹、豇豆、柑桔、馬鈴薯及甘藷等7種作物之種子種苗病毒驗證作業須知，積極推廣種苗驗證觀念。

為持續落實推動驗證業務，2010年6月爰撰擬「落實推動種子種苗疫病蟲害驗證制度方案」，希望勾勒出既符合市場需求並能有效提升作物品質之願景，改造現有制度使驗證方式呈現多元靈活且符合市場需求，另藉由增加業者參與誘因、辦理宣導或業者座談及新技術轉移的方式，積極輔導民間業者參與生產供應高品質種苗，協助民間團體或協（學）會建立疫病蟲害檢定驗證機構，並提高業者自主性管理產品之能力，政府單位則積極研究改進取樣方法及研發快速專一性高且成本低之病害檢定方式，提高檢定效率。

六、安全用藥教育訓練執行情形

農藥是台灣農民慣用於作物有害生物的防治資材，2009年國內成品農藥銷售金額約69億元，使用的有效成分數量約8600噸。另作物重大病害實施共同防治或緊急防治時，經常須要應用化學藥劑來降低田間感染源的密度，並防止其傳播蔓延，但在兼顧有效及安全的原則下，適當合理使用農藥就變得相當重要。故為確保農產品衛生安全，防檢局邀集農糧署、農試所及藥毒所共同研商安全農業的關鍵因素與因應策略及中程規劃，積極建構「農產品安全無縫管理制度」，該制度包括三大構面：（一）加強基礎環境建置及管理；（二）加強作物健康生產管理；（三）強化農產品安全管理。各構面分別再規劃主要工作項目及重點工作項目，防檢局負責的主要工作項目為「推動農民安全用藥輔導」，辦理「確立分工並成立工作小組」、「加強農民教育輔導及追蹤輔導」及「彙編教材及建立資料庫」等3項重點工作。此外，在其他重點工作項目中，防檢局除加強上游農藥法規檢討修訂、協助訂定殘留安全標準及農藥販賣業者管理訓練外，亦要配合農糧署及藥毒所執行強化下游產品農藥殘留監測、推動安全品牌制度（有機農產品、吉

園圃標章及產銷履歷驗證制度等）等多項措施，務必使農民充分瞭解安全用藥的好處及其相關知識，方能落實推動本制度。

為達安全無縫管理之目標，防檢局及相關單位透過縣市政府及地區農會，經常性的辦理對農民及各作物產銷班的輔導說明會等活動，並依據農作物殘留監測資料，針對高風險區域加強辦理安全用藥宣導，課程內容包含安全使用農藥的基本觀念、作物特性、合理化施肥、常見病害防治方法、田間衛生及核准登記用藥等，除傳播最新的正確用藥觀念外，也藉由面對面接觸了解農民的真正需求與其面臨的問題，作為政府施政參考。至2010年8月份止，已辦理相關宣導教育訓練超過200場，農糧署委託藥毒所辦理檢驗蔬果農藥殘留達7,636件，合格件數7,024件，合格率達91.99%。

七、診斷鑑定能力及專業人才之養成

有害生物之正確辨識，是植物防疫監測作業中重要的一環，更是防疫決策判斷的關鍵。植物防疫人員若能適時提供正確的診斷鑑定及有效的防治方法，不但可以協助農民節省防治成本，亦能提升作物的品質及產量。另，在當今競爭激烈的農產品市場，有害生物防治技術及其成本，往往左右農產品能否成功輸銷國際市場之主因；而如何有效避免有害生物之發生危害，則有賴植物防疫人才的養成，並發揮其診斷鑑定與防疫之諮詢管理能力。

為強化第一線植物防疫人員及農民田間生產管理、病蟲害診斷鑑定、防治及用藥能力，防檢局本年度舉辦文旦、水稻病蟲害、洋香瓜病毒病害、柑橘類與草莓病蟲害及栽培管理教育訓練，參與人數約200人。

八、植物防疫檢疫法（以下簡稱本法）之增修訂

為因應植物防疫檢疫實務需求，並配合政府推動設置自由貿易港區等貿易實務，同時以符合法制規範明確本法相關子法之授權依據，有效達到防疫檢疫目的，爰參酌國際規範及國內外相關法規修正本法。本法於1996年1月10日公布施行後，自2000年至2008年曾5度修正，另自2002年起召開

近30次研商會議討論，並於2010年7月15日「研商植物防疫檢疫法修正草案」會議討論後定案。為廣納各界意見，分別於2010年8月及9月間辦理2場公聽會，參照所提意見予以修正後送防檢局局務會議報告通過，後續擬依行政程序法辦理相關法制作業。

有關植物防疫監測及防治在本次修訂之相關法條為中央主管機關得公告管制有害生物種類，並授權植物防疫檢疫機關得對國際間發生未公告之有害生物先行檢疫或防疫之緊急措施；主管機關得為管制有害生物及國內特定有害生物擬訂監測或調查計畫，必要時得公告該些有害生物防治計畫綱要，直轄市及縣市主管機關應依據計畫綱要，擬訂地區防治計畫及編列年度預算，報請中央主管機關核准後實施。未來為有效防治國內之有害生物疫情，中央及地方主管機關應明確分工，以落實推動相關防治措施，確保農民權益及農產品收益。

結論與展望

基於「健康、效率、永續經營」之農業施政理念，農委會推動「精緻農業健康卓越方案」，其中健康農業係以推動作物健康管理模式及推廣吉園圃安全蔬果標章為基石，建立農產品安全無縫管理體系，逐步邁向農業永續經營的理想。然而，作物有害生物種類超過300種，其防治方法仍以化學藥劑為主，目前利用非農藥方法防治病害效果仍相當有限的情況下，為能有效管理作物病害，確保作物生產品質及安全，未來應朝強化各項防疫措施與相關技術之研發，並加強國際疫情資訊蒐集方向邁進，茲分述如下：

一、研發作物病害防治關鍵技術

為解決土壤傳播性病害問題，農試所研發「自走式土壤蒸汽處理機」，於設施栽培之美濃瓜及莧菜園，以物理性蒸汽高溫殺死土壤中病原菌[12]，即是為降低農藥對環境影響所做的努力，未來針對更多棘手的作物病害，亟須成立研究團隊訂定目標，逐年開發其關鍵技術，並將該些技術融入作物健康管理模式，以協助農民解決重大病害防治問題。

二、落實疫情監控，適時籲請農民加強防範

落實疫情監控是防範作物病害擴散蔓延的首要工作，監測點設置越多越能掌握疫情，惟限於人力及經費，無法大幅擴增監測點，防檢局未來將聘請地方疫情調查員執行監測工作，訓練優秀的農民及農藥販賣業者調查當地作物病害，如洋香瓜重要病毒、水稻稻熱病及白葉枯病等，並將調查資料傳送防檢局分析後，適時將疫情資料傳送至高風險疫區，籲請農民注意防治，期望能發揮適時適地，動員農民以正確的防治方法或農藥，防治重大作物病害之發生。

三、強化診斷鑑定能力及培訓專業人才

2010年高雄地區發生一期作水稻稻熱病，農民進行藥劑防治後不慎造成藥害，卻誤以為病害未受控制，持續用藥結果致藥害更為嚴重，因此，診斷鑑定能力的提升、國家型診斷鑑定實驗室的設立、基層植物防疫專責機構的建置、專業人員素質的提升，都是未來應該努力的方向。為強化植物防疫現職人員、農民之專業知識，彌補目前田間診斷專業訓練之不足，防檢局爰規劃「植物病蟲害診斷、防治及用藥人才培訓方案」，朝舉辦有系統的訓練課程規劃，包括培訓第一線植物防疫人員、開辦大專院校學分班或在職專班、學士後植物醫學學程、建立線上專家知識庫平台及推動植物醫師相關立法工作等事項。

四、加強蒐集國際疫情，適時增修訂相關法規，強化防疫措施

隨著兩岸及全球農產貿易愈趨頻繁，各類作物病害入侵我國之風險持續增加，未來應加強蒐集鄰近國家發生之重要經濟作物病害資訊，適時增修訂相關法規，將高風險病害列入檢疫規定或列入監測對象，並強化緊急撲滅機制與措施，俾利及時控制疫情，降低對農業生產、農民生計與生態環境之影響。

謝　　辭

感謝農業試驗改良場所、農業藥物毒物試驗所、種苗場、茶改場、縣市政府及相關大專院校進行試驗及舉辦相關訓練，方得以順利撰寫前揭資料；另繕寫期間，承蒙防檢局植物防疫組同仁提供相關資料，李健新先生及陳泊崧先生協助統計及撰寫資料，藥毒所尹建盛先生協助繪製空間分布圖，在此致上無限謝忱。

引用文獻

1. 王堂凱、蔡偉皇、方尚仁、顏辰鳳。2009。水稻疫病蟲害監測、共同防治及其展望。台灣水稻保護成果及新展望研討會專刊。13-28頁。
2. 古德業。2003。永續管理植物保護成果與衝擊。植物保護管理永續發展研討會專刊。1-22頁。
3. 邱安隆、陳保良、張瑞璋。2010。台南地區洋香瓜病毒病防治策略及其執行成效。豐年半月刊60(17)：34-37。
4. 高清文。2000。我國植物防疫的現況與未來展望。植物疫情與策略研討會專刊。5-11頁。
5. 動植物防疫檢疫局2011年預算書。
6. 張清安。2008。作物健康種苗在病害管理上之回顧與展望。節能減碳與作物病害管理研討會。61-86頁。
7. 張致盛。2010。氣候變遷對臺灣果樹生產影響與因應對策。氣候變遷與糧食危機研討會專刊。53-66頁。
8. 張瑞璋、陳保良、邱安隆。2010。台灣檬果蟲害現況分析及防治策略。檬果產銷暨蟲害管理研討會專刊。1-10頁。
9. 張廣淼、彭淑貞、黃勝泉。2010。草莓苗期病蟲害整合性防治。苗栗區農業改良場編印摺頁。
10. 黃德昌、許育慈、周泳成。2010。氣候變遷對水稻病害相之可能影響及其因應策略。氣候變遷與糧食危機研討會專刊。67-84頁。

11. 黃鴻章、黃振文、謝廷芳。2008。作物有機栽培之病害管理技術。永續農業之植物病害管理。248-264頁。
12. 農業試驗所。2010。生產健康安全蔬果的第一步驟─利用蒸汽處理管理土壤連作障礙問題。豐年半月刊60(16)：26-27頁。
13. 蔡偉皇。2009。台南地區洋香瓜病毒病害及其防治。動植物防疫檢疫局季刊21：18-20。
14. 顏辰鳳、郭克忠。2009。植物疫情監測與展望。糧食作物暨植物保護研討會專刊。128-135頁。
15. 顏辰鳳、鄒慧娟、黃德昌。2005。重大植物檢疫有害生物偵測執行績效。農政與農情 154：37-42。
16. 顏辰鳳、彭瑞菊、陳昇寬、黃莉欣、周泳成。2007。預防洋香瓜病毒發生及蔓延危害。豐年半月刊57(20)：53-56。
17. BCC Research。2010。Biopesticides，The Global Market，2010/02。台灣經濟研究院生物科技產業研究中心整理，台北。
18. P. J. Ann, J. N. Tsai, I. T. Wong, T. F. Hsieh, and C. Y. Lin. 2009. A simple technique, concentration and application schedule for using neutralized phosphorous acid to control Phytophthora diseases. Plant Pathol. Bull. 18:155-165.(in Chinese).

ABSTRACT

Control strategies and the implementation of important crop diseases and the future prospects of plant protection in Taiwan

Chang R. J. [1], Chiou, A. L. [1], Hsu, M. H. [1], and Yen, C. F. [1,2]

[1] Plant Protection Division, Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine, Council of Agriculture, Taipei 100, Taiwan, R.O.C.

[2] Corresponding author, Email: cfyen@mail.baphiq.gov.tw

Twelve important quarantine pests of crops, including nematodes, bacteria and viruses, were placed under detection survey by the Bureau of Animal and Plant Health Inspection and Quarantine (BAPHIQ), and emergency measures based on the standard operation procedure for eradication would be initiated if any one of the above pests was found. In addition, fourteen domestic important crop diseases were monitored actively, and the occurrences of the 14 diseases collected from the monitoring survey which may indicate the potential threat to crops would be transmitted instantly via the agricultural communication platform "Farmer's Good Hands ", which set up by the Council of Agriculture, Executive Yuan, by using facsimile or Short Message Service (SMS) to inform farmers or agriculture related services for preventing diseases from spreading. To assist farmers in solving problems of pesticide residues and important crop diseases, for example, the rice blast and the viral diseases of melon, the BAPHIQ has implemented a pest alert system using monitoring survey data, strengthened educational programs for farmers to obtain information on disease management and pesticides, and demonstrated an area-wide coordinated control model for melon diseases prevention. For promoting integrated pest management (IPM) in controlling diseases on 18 economically important crops such as fruit, vegetable and tea, more than 200 training courses on how to use pesticide safely and properly were conducted for farmers and agencies from plant protection services. To prevent seed- and seedling-borne diseases from spreading, a mandatory seedling inspection program has been carried out on anthurium since 2000, also the requirements of

seven other voluntary seed and seedling certification systems including *Phalaenopsis* orchids, vegetables and fruits, have been promulgated by BAPHIQ to promote the awareness on use of certified seeds and seedlings. In 2010, the BAPHIQ organized several pest management workshops on shaddock, rice, melon, citrus and strawberry for about 200 persons from agricultural extension services to enhance their capability on crop production practices, pest and disease diagnosis, control method and pesticides. To accomplish the policy goals of BAPHIQ in establishing a sound system of plant health inspection and quarantine, the strategies on crop protection should be carefully adjusted to align with the international trends, including the improvement of the efficiency of the system on monitoring and controlling of the important crop diseases, strengthening the employment of integrated control measures against crop diseases and continuously developing new technology for better control methods. Besides, efforts on collecting information of global crop epidemics, exchanging experiences in the prevention of the spread of diseases through international cooperation and amending plant protection laws and regulations timely would also be necessary to safeguard agricultural products and consumer's health and ensure sustainable agriculture.

Key words: Control strategy, Detection survey, Monitoring survey, Integrated pest management, Seed and seedling certification

重大植物病害之認定及其因應措施

黃鴻章[1,3]、謝廷芳[2]

[1] Agriculture & Agri-Food Canada, Research Centre, Lethbridge, Alberta, Canada (*Emeritus*); Present Address: 農業委員會農業試驗所植物病理組

[2] 行政院農業委員會農業試驗所花卉研究中心

[3] 聯絡作者，電子郵件信箱：Hchuang39@gmail.com

摘　要

植物病害種類可以分成生物性(傳染性)與非生物性(非傳染性)兩大類。引起生物性病害的病原有真菌、細菌、菌質、線蟲、濾過性病毒及寄生性高等植物等等；而造成非生物性的因子則有凍傷、日燒、乾旱、藥害、肥傷、風害、冰雹、雷電、機械傷害及環境污染等。很多生物性引起的病原具高度傳染性，一旦流行傳播，往往造成作物減產和重大經濟損失。本文僅以 1970 年代末期在美國、加拿大及 1980 年代初期在日本首次發現的病害苜蓿黃萎病(Verticillium wilt of alfalfa 由真菌 *Verticillium albo-atrum* 引起)為例，來討論有關重大植物病害之認定及其因應措施等問題。本病自 1976 年在美國西北部苜蓿田首次發現後，迅速蔓延到美國和加拿大很多地區，而成為眾所關注的重要病害。它之所以能受到有效控制是歸功於積極進行病害調查和研發有效病害防治策略如加強防、檢疫工作和開發新抗病品種等。

關鍵詞:　病害發生、植物防檢疫、病害流行、病害防治

緒　　言

植物病害種類可以分成生物性與非生物性兩大類。引起生物性病害的病原有真菌、細菌、菌質、線蟲、濾過性病毒及寄生性高等植物等；而造成非生物性的因子則有凍傷、日燒、乾旱、藥害、肥傷、風害、冰雹、雷電、機械傷害及環境污染等。很多生物性引起的病原具有高度傳染性，一旦流行傳播，往往造成作物重大經濟損失。以豆科植物苜蓿 (alfalfa 學名 *Medicago sativa*) 為例，它是北美的重要經濟作物之一。苜蓿莖葉富含蛋白質可做為動物飼料，種子可用以生產苜蓿芽做為餐館重要食材。如果苜蓿因為重大病害病而無法生產，它影響的層面不僅是從事苜蓿牧草和種子生產的農民和苜蓿加工業者，而且會對肉牛業、乳牛業、以及用於苜蓿種子生產的切葉蜂 (leafcutter bee 學名 *Megachile rotundata*) 飼養業造成極大衝激。本文用 1970 年代末期在美國[19]、加拿大[5]及日本[43]首次發現的苜蓿黃萎病 (Verticillium wilt of alfalfa 由 *Verticillium albo-atrum* 引起) 為例，來討論重大植物病害之認定方法及其因應措施等問題。

重大植物病害之認定

每一作物病害的發生和嚴重性，因病原菌種類及其致病性 (pathogenicity)、流行性 (epidemiology) 和病害普遍性 (disease distribution) 與嚴重性 (disease severity) 而異。一個新發現的病害必定會引起廣泛重視，但是否會成為一重大病害則必需依照其蔓延速度、作物產量和經濟損失情形而定。因此認定重大病害的手段包括病害發生調查，評估作物受害程度和病害蔓延情形，以確認其經濟重要性。例如由黑白輪枝菌 (*Verticillium albo-atrum*) 所引起的苜蓿黃萎病，它是一系統性病害[26, 41]。本病於 1918 年首次在瑞典[23]出現後，就在歐洲的溫帶地區迅速蔓延，成為歐洲地區苜蓿的主要病害。但是北美洲早期苜蓿病害調查報告中，在美國仍未出現本病[36]，直到 1976 年才在美國西北部[19]與 1977 年在加拿大西部 British Columbia 省[44]的農田裡首次被發現。其後病害調查發現本病發生於

美國包括 Pacific Northwest 諸州[10, 19]和 California[13]，Wisconsin[37]，Wyoming[40] 諸州和加拿大包括西部的 British Columbia[44]，Alberta[25]和 Saskatchewan[18]省; 中部的 Ontario[6,7,46]，和 Quebec[39,42]省; 和東部的 Prince Edward Island[38]省。在 Manioba 省和 British Columbia, Alberta 和 Saskatchewan 等省的中部苜蓿產區仍無本病發生。又雖然苜蓿是多年生作物，一旦發生苜蓿黃萎病往往使生產年限由正常的七年縮短為 3-4 年而增加生產成本[5]。所以本病發生後由於蔓延迅速、受害嚴重而威脅牧草和苜蓿種子生產，因此於 1980 年代本病被生產者與業界認定為北美苜蓿最重要的病害。

瞭解作物病害從發源地向外擴散和傳播範圍是很重要的關鍵。苜蓿黃萎病是一種系統性病害 (systemic disease)，它的病菌可藉由受害莖葉和種子[8, 9, 11, 14, 31, 35, 45]，並透過貿易或種原交換等途徑而自疫區傳播到其他無病地區。據推測本病可能是經由帶菌種子而流入北美洲[22]。同樣地，苜蓿黃萎病於 1981 年首次出現於日本北海道地區，也肇因於由國外引進帶菌種子所惹出來的禍害[43]。

除受黃萎病危害的苜蓿莖葉和種子可在區域內短距離或長距離跨海傳播之外[22]，很多研究顯示本病尚可藉由其它管道四處散播、威脅更多苜蓿田而使經濟遭到重創。苜蓿黃萎病除可經由空氣[12]、流水、農機具[24]外，加拿大的研究發現此病菌還可經由動物糞便[33]和許多種昆蟲攜帶[21]。其中很多害蟲如蚜蟲[30]、蝗蟲和苜蓿象鼻蟲[27]等都是本病的媒介昆蟲。實驗證明蚜蟲[30]和苜蓿象鼻蟲[27]能夠將身上所攜帶的病原孢子，傳播至苜蓿植株，並藉由咀嚼的傷口，促使孢子發芽，進而侵入植株引起黃萎病。另一實驗證明蝗蟲吃食苜蓿黃萎病葉片，所排出的糞便也能傳播病原菌使苜蓿植株產生黃萎病[27]。

由於苜蓿是異花授粉的植物，必須藉由傳粉昆蟲如苜蓿切葉蜂的幫助授粉，才能提高種子產量[15]。但是切葉蜂不但會在發病田中藉採蜜的過程攜帶苜蓿黃萎病菌的孢子 (conidia)，而且也會在病田中採剪病葉帶回蜂巢中來做繭[29]。這種帶菌的蜂繭有可能經貿易過程而做遠距離傳播。另外研究

又發現苜蓿黃萎病菌可直接侵染苜蓿花粉[28]，它所侵染的苜蓿花粉也有可能由切葉蜂携帶[32]而傳播到其他苜蓿植株。

苜蓿黃萎病自 1970 年代末期在北美田間首次被發現後，即快速傳播擴散蔓延而成為一重要苜蓿新病害。本病之倍受關注不只是因為它是新發現病害，而且是在病害調查和研究中發現本病可經由多種管道 (如種子、昆蟲等) 快速傳播蔓延於美、加很多苜蓿生產地區，嚴重影響該作物的產量和品質[34,48]、造成重大經濟損失[47]。由此可見一新興病害是否能成為重要病害要依其發生普遍性、危害程度 (severity)，傳播途經 (epidemiology)、以及經濟重要性 (economic impact) 而定。

重大植物病害之因應措施

每一新作物病害很容易受關注，但是最確重要的是要盡速確認它的發生、蔓延、經濟重要性、並盡速研發該病害的防治策略。玆以苜蓿黃萎病在北美發現後的因應方法說明如下。

1. 展開病害調查。本病於 1976 年在美國西北部[19]與 1977 年在加拿大西部 British Columbia 省[44]的農田首次被發現後，在加拿大很快發動全國苜蓿田調查機制，期以瞭解本病發生與蔓延情形[5, 7, 17, 25, 46]。在美國很多大學和聯邦政府、州政府等研究和推廣機構也紛紛展開調查本病發生情形[4, 10, 13, 16]。
2. 建立病害防檢疫的策略。由於苜蓿黃萎病可經由受害種子、莖葉、空氣、流水、農機具和媒介昆蟲等多種方法傳播。它也可能透過貿易過程進行長距離(跨國) 或短距離傳播。加拿大政府乃以本病在全國苜蓿生產區的調查資料[5, 25]建立檢疫措施。其檢疫法規中規定自他國輸入加國的苜蓿種子、乾草等必需經過檢驗。在國內疫區 (如 British Columbia 省南部和 Alberta 省南部) 所生產的苜蓿不得運往非疫區 (如 British Columbia 省和 Alberta 省中部和北部以及 Manitoba 全省等)。其他方法包括銷毀罹病苜蓿田，用殺菌劑得恩地 (Thiram) 處理種子 (本法規已於 1993 年取消) 和採用無病認證種子 (certified seeds) 等。日本於 1981 年首次在日本北海

道 Sorachi 地區出現苜蓿黃萎病[43]後，迅速訂定本病檢疫措施(http://www.co.kern.ca.us/kernag/phytotxt/Japan.pdf)。該檢疫法規規定，自國外進口苜蓿乾草(hay, cubes 等)必需出具檢疫證明 (Phytosanitary Certificate)。苜蓿乾草可經由燻蒸消毒 (Alfalfa Hay Fumigation Certification Program for Japan) 後進口，至於苜蓿地下根莖則必需有入境許可 (Import Permit) 和檢疫證明 (Phytosanitary Certificate) 才准予進口，而且必需先取得入境許可後才准予核發檢疫證明。針對苜蓿種子進口，日本政府規定必須出具檢疫證明。又苜蓿種子經檢驗如有下列項目之一者即禁止進口 (不核發檢疫證明)： 1) 苜蓿種子中參雜麥角菌 (ergot;學名為 *Claviceps purpurea*) 之菌核 (sclerotia)超過 0.05% (即 500 mg/kg)；2) 苜蓿種子中參雜菌核病菌 (學名為 *Sclerotinia sclerotiorum*) 之菌核 (sclerotia) 超過 0.01% (即 100 mg/kg)；和 3) 苜蓿種子中參雜任何土壤 (zero tolerance for soil in seed shipments)。

3. 設立苜蓿種子生產專業區與加强病蟲害檢驗，以生產品質優良之健康種子。這種生產區大都選在比較偏僻隔離的地方，而且有嚴密的田間衛生管理規定，如清除雜草和去除弱小有病或畸型植株等。另外，還要針對此一病害訂定田間調查與種子認證 (seed certification) 標準，如果達不到這些特定標準之要求，則該田區作物就不得做為留種之用。
4. 研發抗病品種。抗病育種是作物病害最有效的防治策略。苜蓿黃萎病在美國出現後，除了公立研究機構之外，很多私立公司紛紛成立研究團隊進行本病抗病育種計畫。其後競相推出很多抗黃萎病新苜蓿品種，以謀取種子銷售利益。加拿大農業部自 1981 年成立一全國性研究團隊負責研發抗黃萎病的苜蓿新品種，該育種計畫育成了三個抗黃萎病的苜蓿新品種，包括 Barrier[20]、AC Blue J[3]及 AC Longview[1]。這些抗病品種每年平均乾草產量每公頃比感病的苜蓿品種約高出 1.5 公噸[34]。又苜蓿是一多年生豆科牧草，如果栽培易遭黃萎病菌侵染的感病品種，大約 3-4 年就要廢耕，但是栽培抗病品種則可以延長一倍以上的收穫年限。經由經濟評估在加拿大西部栽培這些抗黃萎病的苜蓿品種，每年大約可增加兩千七百萬元(加幣)的經濟效益[2, 47]。由於這幾個抗病品種的推廣栽培，使加拿大

苜蓿黃萎病疫情顯著減輕。在美國針對栽培抗黃萎病苜蓿品種的經濟效益也有多篇報導[40, 48]。

結論與展望

作物病害一旦被發現就要盡速調查其起因、來源、分佈情形、傳播速度以及其危害程度，並用這些資料評估該病害的經濟重要性。如果該病害被確認具有潛在重要性之病害 (high impact disease)，就應積極透過推廣與研發等手段來防止本病之擴散蔓延。研發策畧除訂定防檢疫法規以有效防堵該病害之長途 (跨國貿易)與短途 (區域性或田間) 傳播之外，還要積極研發該病害之快速檢測技術 (如研發分子探針，選擇性培養基等技術) 做為進出口農產品進行快速檢驗、病害調查與防治之工具。其他還包括研發有效的田間病害防治技術如設立種子生產專業區，訂定田間調查與種子認證標準以生產高品質之健康種子 (或種苗)，研發抗病、豐產、優質作物品種，和研發有效方法防止病菌媒介 (如昆虫等) 之傳播等。因此要有效因應作物新病害可能帶來的衝激，政府必需提高農業研究經費投入和依賴產學界密切合作才能有效控制新病害可能帶來的衝激。

引用文獻

1. Acharya, S.N., and Huang, H.C. 2000. AC Longview alfalfa. Can. J. Plant Sci. 80:613-615.
2. Acharya, S. N., and Huang, H. C. 2003. Breeding alfalfa for resistance to verticillium wilt: A sound strategy. Pp 345-371 *in*: H. C. Huang and S. N. Acharya (eds.) Advances in Plant Disease Management. Research Signpost, Trivandrum, Kerala, India.
3. Acharya, S.N., Huang, H.C., and Hanna, M.R. 1995. Registration of "AC Blue J" alfalfa. Crop Sci. 35:1225-1226.
4. Arny, D.C., and Grau, C.R. 1985. Importance of Verticillium wilt of alfalfa

in North America. Can. J. Plant Pathol. 7:187-190.

5. Atkinson, T.G. 1981. Verticillium wilt of alfalfa: Challenge and opportunity. Can. J. Plant Pathol. 3:266-272.
6. Basu, P.K. and Brown, N.J. 1988. Incidence of Verticillium wilt of alfalfa in eastern Ontario. Can. Plant Dis. Surv. 68:65-67.
7. Busch, L.V., and Christie, B.R. 1982. Combating verticillium wilt of alfalfa. Highlights of agricultural research in Ontario. 5:4-6.
8. Christen, A.A. 1982a. Demonstration of *Verticillium albo-atrum* in alfalfa seed. Phytopathology 72:412-414.
9. Christen, A.A. 1983. Incidence of external seed-borne *Verticillium albo-atrum* in commercial seed lots of alfalfa. Plant Dis. 67:17-18.
10. Christen, A.A., and Peaden, R.N. 1981. Verticillium wilt in alfalfa. Plant Dis. 65:319-321.
11. Christen, A.A., and Peaden, R.N. 1982. Relative importance of sources of Verticillium wilt infestation in alfalfa. Phytopathology 72:960. (Abstract)
12. Davies, R.R., and Isaac, I. 1958. Dissemination of *Verticillium albo-atrum* through the atmosphere. Nature (London) 181:649.
13. Erwin, D.C., and Khan, R.A.1988. Verticillium wilt of alfalfa in southern California caused by *Verticillium albo-atrum*. Plant Dis. 72:453.
14. Gilbert, R.G., and Peaden, R.N. 1988. Dissemination of *Verticillium albo-atrum* in alfalfa by internal seed inoculum. Can. J. Plant Pathol. 10:73-77.
15. Goplen, B.P., Baenziger, H., Bailey, L.D., Gross, A.T.H., Hanna, M.R., Michaud, R., Richards, K.W., and Waddington, J. 1980. Growing and managing alfalfa in Canada. Agr. Can. Publication 1705. Agr. Can., Ottawa. 49 pp.
16. Gordon, T.R., Correll, J.C., Gilchrist, D.G., and Martensen, A.N. 1989. Verticillium wilt of alfalfa in California. Plant Dis. 73:18-20.
17. Gossen, B.D., and Jesperson, G. 1988. Survey of irrigated alfalfa in

Saskatchewan. Can. Plant Dis. Surv. 68:61.

18. Gossen, B.D., Kaminski, D.A., and Coulman, B. 1995. Survey for Verticillium wilt of alfalfa under irrigation in Saskatchewan, 1991-94. Can. Plant Dis. Surv. 75:164-165.
19. Graham, J.H., Peaden, R.N., and Evans, D.W. 1977. Verticillium wilt of alfalfa found in the United States. Plant Dis. Rep. 61:337-340.
20. Hanna, M.R., and Huang, H.C. 1987. 'Barrier' alfalfa. Can. J. Plant Sci. 67:827-830.
21. Harper, A.M., and Huang, H.C. 1984. Contamination of insects by the plant pathogen *Verticillium albo-atrum* in an alfalfa field. Environ. Entomol.13:117-120.
22. Heale, J.B., Isaac, I., and Milton, J.M. 1979. The administrative control of verticillium wilt of lucerne. *In:* Ebbels, D.L., and King, J.E. (eds.). Plant Health: The Scientific Basis for Administrative Control of Plant Diseases. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford. pp. 71-78.
23. Hedlund, T. 1923. Om Nagrasjukdomar och skador pa vara lantbruksvaxter. Sver. Allm. Jordbrukstidskr. 5:166-168.
24. Howard, R.J. 1985. Local and long-distance spread of *Verticillium* species causing wilt of alfalfa. Can. J. Plant Pathol. 7:199-202.
25. Howard, R.J., Huang, H.C., Traquair, J.A., Moskaluk, E.R., Kokko, M.J., and Philippe, L.M. 1991. Occurrence of verticillium wilt of alfalfa in southern Alberta, 1980-86. Can. Plant Dis. Surv. 71:21-27.
26. Huang, H.C. 1989. Distribution of *Verticillium albo-atrum* in symptomed and symptomless leaflets of alfalfa. Can. J. Plant Pathol. 11:235-241.
27. Huang, H.C., and Harper, A.M. 1985. Survival of *Verticillium albo-atrum* from alfalfa in feces of leaf-chewing insects. Phytopathology 75:206-208.
28. Huang, H.C., and Kokko, E.G. 1985. Infection of alfalfa pollen by *Verticillium albo-atrum*. Phytopathology 75:859-865.
29. Huang, H.C., and Richards, K.W. 1983. *Verticillium albo-atrum*

contamination on leaf pieces forming cells for the alfalfa leafcutter bee. Can. J. Plant Pathol. 5:248-250.

30. Huang, H.C., Harper, A.M., Kokko, E.G. and Howard, R.J. 1983. Aphid transmission of *Verticillium albo-atrum* to alfalfa. Can. J. Plant Pathol. 5:141-147.
31. Huang, H.C., Hanna, M.R. and Kokko, E.G. 1985. Mechanisms of seed contamination by *Verticillium albo-atrum* in alfalfa. Phytopathology 75:482-488.
32. Huang, H.C., Richards, K.W. and Kokko, E.G. 1986. Role of the leafcutter bee in dissemination of *Verticillium albo-atrum* in alfalfa. Phytopathology 76:75-80.
33. Huang, H.C., Hironaka, R. and Howard, R.J. 1986. Survival of *Verticillium albo-atrum* in alfalfa tissue buried in manure or fed to sheep. Plant Dis. 70:218-221.
34. Huang, H.C., Acharya, S.N., Hanna, M.R., Kozub, G..C., and Smith, E.G. 1994. Effect of verticillium wilt on forage yield of alfalfa grown in southern Alberta. Plant Dis. 78:1181-1184.
35. Isaac, I., and Heale, J.B. 1961. Wilt of lucerne caused by species of *Verticillium.* III. Viability of *V. albo-atrum* carried with lucerne seed; effect of seed dressings and fumigants. Ann. Appl. Biol. 49:675-691.
36. Kreitlow, K.W. 1962. Verticillium wilt of alfalfa. A destructive disease in Britain and Europe not yet observed in the United States. U. S. Dep. Agric., Agric. Res. Serv. 34-20. 15 pp.
37. Lindermann, J., Arny, D.C., and Delwiche, P.A. 1982. Detection of *Verticillium albo-atrum* in the air over infected alfalfa fields in Wisconsin. Phytopathology 72:1382 (Abstract).
38. Martin, R.A., and Boswall, P. 1989. First occurrence report of Verticillium wilt of alfalfa on Prince Edward Island. Can. Plant Dis. Surv. 69:51.
39. Nicholls, H., Richard, C., and Martin, J.-G. 1987. Verticillium wilt of

alfalfa in Quebec. Can. Plant Dis. Surv. 67:17-21.

40. Page, M.S., Gray, F.A., Legg, D.E., and Kearl, W.G. 1992. Economic impact and management of Verticillium wilt on irrigated alfalfa hay production in Wyoming. Plant Dis. 76:504-508.
41. Pennypacker, B.W., and Leath, K.T. 1983. Dispersal of *Verticillium albo-atrum* in the xylem of alfalfa. Plant Dis. 67:1226-1229.
42. Richard, C., and Nicholls, H. 1988. Survey of Verticillium wilt of alfalfa in Quebec, 1986-1987. Can. Plant Dis. Surv. 68:72-73.
43. Sato, R. 1994. Outbreak of alfalfa Verticillium wilt in Hokkaido. Japan Agric. Res. Quart. 28:44-51.
44. Sheppard, J.W. 1979. Verticillium wilt, a potentially dangerous disease of alfalfa in Canada. Can. Plant Dis. Surv. 59:60.
45. Sheppard, J.W., and Needham, S.N. 1980. Verticillium wilt of alfalfa in Canada. Occurrence of seed-borne inoculum. Can. J. Plant Pathol. 2:159-162.
46. Smith, B.D., Busch, L.V., and Boland, G.J. 1988. Survey of Verticillium wilt of alfalfa in southern Ontario. Can. Plant Dis. Surv. 68:68-69.
47. Smith, E.G., Acharya, S.N., and Huang, H.C. 1995. Economics of growing verticillium wilt resistance and adapted alfalfa cultivars in western Canada. Agronomy J. 87:1203-1207.
48. Viands, D.R., Lowe, C.C., Bergstrom, G.C., Vaughn, D.L., and Hansen, J.L. 1992. Association of level of resistance to verticillium wilt with alfalfa forage yield and stand. J. Production Agric. 5:504-509.

ABSTRACT

Assessment and Management of High Impact Diseases of Crops

Huang, H. C.[1, 3], and Hsieh, T. F.[2]

[1] Agriculture & Agri-Food Canada, Research Centre, Lethbridge, Alberta, Canada (*Emeritus*); Present Address: Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Wu-feng, Taichung 413, Taiwan.

[2] Taiwan Agricultural Research Institute, COA, Taiwan, R.O.C.

[3] Corresponding author, Email: Hchuang39@gmail.com

Plant diseases may be due to biotic factors such as fungi, bacteria, mycoplasma, viruses, nematodes and parasitic plants or abiotic factors such as freezing injury, sun scorch, drought injury, injury of agrochemicals (pesticides and fertilizers) or environmental pollutants, wind damage, hail injury and mechanical injury. Most of the biological agents are contagious and capable of spreading via infected plants. A crop disease is considered high risks if it spreads rapidly and causes severe economic loss. The outbreak of a new crop disease will likely draw attention but its potential impacts depend upon mode of infection and means of spreads of the pathogen as well as economic impacts of the disease. Verticillium wilt of alfalfa, an important disease in Europe since 1918, was first found in some commercial fields of alfalfa in North America in 1976. The disease spread rapidly to all major alfalfa production areas in the USA and Canada in 1980s and 1990s because of numerous methods for dispersal of the pathogen and lack of resistance in commercial alfalfa cultivars. The outbreak of this disease in North America is used as an example to discuss strategies for assessment and management of new and high impact diseases in crops.

Key Words：Disease occurrence, Plant quarantine, epidemiology, Plant disease control

柑桔黃龍病之研究及健康管理

蘇鴻基 [1,3], 蔡佳欣 [2], 馮雅智 [1], 洪挺軒 [1]

[1] 台北市 國立台灣大學植物病理與微生物學系

[2] 台中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組

[3] 聯絡作者，電子郵件信箱：hjsu@ntu.edu.tw

摘 要

柑桔黃龍病(Huanglongbing=HLB, greening)於 1943 年由華南首次發現報告，於 1947 年在南非發生以 greening 病名發表。在台灣光復後 6 年，於 1951 年首次發現此病，經松本教授認定為新病，並命名為立枯病(Likubin)，到 1956 年此病蔓延本島各地嚴重發生，松本教授等開始其病因研究，証實為經嫁接可傳播之似病毒病害，此病於 1961 年正式在美國 Florida 召開第二屆 IOCV 國際會議由松本教授發表。病原菌以電顯切片觀察發現係韌皮部侷限，存活於篩管中不能培養之特異細菌，屬 *Candidatus* Liberibacter asiaticus，作者等以病原性及毒性之生物鑑定發現有四種系統(strain)存在於台灣，並常與萎縮病毒(CTV)及破葉病毒(CTLV)混合感染。此病造成病株葉片出現黃化斑駁(yellow mottling)病徵，樹勢衰弱終至枯萎。在分子診斷試劑開發上，經病菌基因 DNA 選殖，獲得病菌特異性 DNA 片段，而研發為一非放射性標誌之核酸探針(DNA probe)，用於點漬雜配法。之後又經定序設計引子，建立 PCR 測定法，成為快速準確檢疫技術。另再創製碘液簡易檢疫法。此系統性病害之防治一般採用綜合防治之健康管理法，包括無病柑苗之生產與種植、傳染源之撲滅及媒介昆蟲之防驅以防止病害之傳播蔓延。建立無病柑桔種苗體系為首要防治對策。頂梢微體嫁接改進法獲得之無病柑桔原種及無病原種網室之建立，可供無病芽/穗繁殖株之生產而建立其苗圃，由合格網室苗圃業者以快速繁苗法生產無病柑苗，供柑農種植。從媒介柑桔木蝨之寄主範圍中發現野生烏柑仔(*Severinia buxifolia*)為黃龍病菌之中間寄主，帶病病株成為傳染源，田間衛生以病株及中間寄主之隨時

掘除為要。流行病學研究顯示由柑桔木蝨週年密度動態、帶毒率之頻度、飛來蟲量頻度及柑株感染率與潛伏期等監測資料判定嘉義地區柳橙之感染高峰在 2 月底至 3 月間，此期為柑桔木蝨之防驅關鍵期。對罹病大柑株在發病初期(病葉比率占樹冠一半以下)以加壓注射器將 1000 ppm 四環黴素注射病株三次，具有藥療效果。按驗證法規並進行無病苗之生產與推廣為黃龍病防治之首要對策。

關鍵詞： 柑桔黃龍病、病菌系統、健康管理、無病柑桔種苗體系

緒　　言

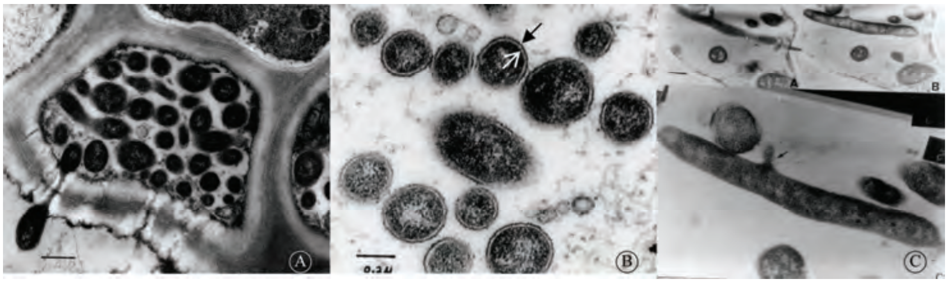
柑桔黃龍病(Huanglongbing=HLB, yellow shoot)於 1943 在中國南方已被發現[8]，而相似病害 citrus greening 於 1947 首次報告於南非[7]。在台灣於 1951 首次出現類似病害，稱為立枯病(Likubin)[18]。此病源推想應是 1945 後從華南經帶病之柑桔種苗、接穗傳入台灣。黃龍病起初認為起因於不良土壤因子例如肥份缺乏或排水不良等所引起。但經上述因素改進後，此病仍不能改善。松本等從 1956 此病流行變嚴重後開始研究此病因[18]。經嫁接傳播試驗証實此新病係病接穗傳染之似病毒性系統病害，命名為立枯病[19]。此病在 1960 年代蔓延到東南亞國家，竟在熱帶、亞熱帶柑桔產區嚴重流行為害。於 1988 在靠近台灣東北之日本沖繩 Iriomote 島也發生[20]，至 2003 續而傳播到日本鹿兒島縣之 Tokunoshima 島[11]。此病 2004 報告發生於巴西[16]，而 2005 發生於美國佛羅里達[6]。HLB 之繼續蔓延對現今之世界柑桔產業構成嚴重為害之威脅。屬熱敏感型之南非 HLB 菌在涼溫(22-24℃)發病。屬耐熱型之亞洲型 HLB 菌在高溫(27-32℃)及涼溫均能發病為害，而比南非型發病嚴重，縮短樹齡短於 10 年，嚴重減低產量及果實品質，近幾十年在熱帶、亞熱帶之亞太地區流行發生。為發展防治技術近數十年來在台灣推展 HLB 之病因、偵測、流行病學及病害管理等研究[1, 2, 3, 4, 19, 27]。黃龍病菌往往與萎縮病毒(CTV)及破葉病毒(CTLV)混合感染引起嚴重黃化斑駁而衰萎病徵，終至植株枯萎。此系統性病害經無性繁殖苗傳播以及媒介木蝨昆蟲於田間傳播，通常以綜合防治法為防治策略。無病種苗之建立係首要防治對策。

病因研究

立枯病(LCB)病株呈全株黃萎病徵與生理病相似，早期認為由不良土壤因素所引起，但經土壤與施肥、微量元素施用與排水改良等均未能防治改善此病。吾等從1956年起進行病因研究[18]。經病接穗/芽之嫁接接種試驗証實此病為似病毒病害，且發現病株經常檢測到萎縮病毒(CTV)[19]。後來發現健康柑株也往往有CTV感染，但CTV單獨感染不會引起HLB病徵。而接種HLB病穗/芽之枳殼株(CTV免疫品種)，再將其病穗/芽接種到健康柑苗亦引起HLB典型病徵，証實病株為混合感染，病原不單是CTV。著者(1968)發現本病引起典型病徵與中國黃龍病之病徵極為相似[8]，因而推定立枯病(LCB)之病原與黃龍病(HLB)之病原相同[18, 27]。Calavan(1968)亦曾推想台灣之立枯病與中國大陸之黃龍病(yellow shoot)、南非之greening及美國之stubborn有很多相似特徵。

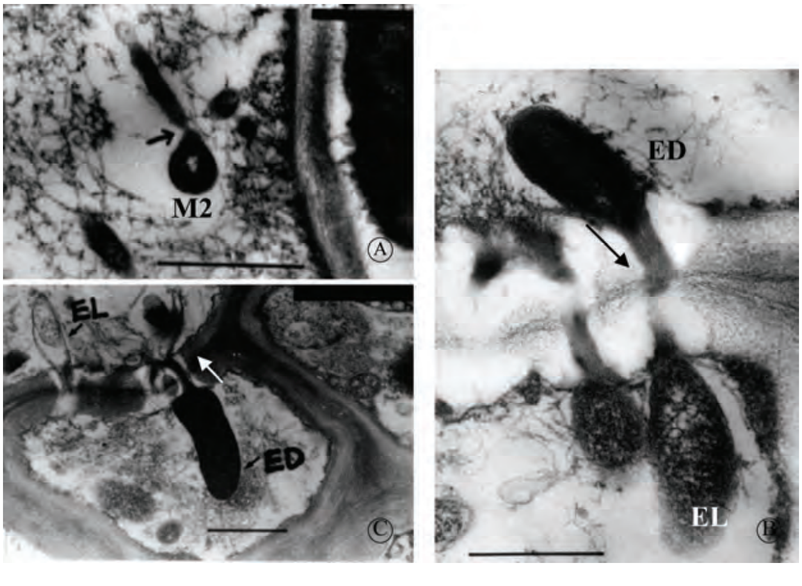
1. 病原菌之電子顯微鏡觀察

病原菌之電顯觀察研究由研究生黃安利於1983-1987間完成[3]，經病葉脈超薄切片之電顯觀察發現黃龍病菌生存於篩管中之原核菌(圖一, A)，經系列切片之立體構造觀察，此菌多形態性，菌體橫切面呈圓形而胞膜由外側細胞壁(7.5 nm)及內側原形質膜(7.5 nm)兩層所構成，20-25 nm厚，因此屬細菌類(圖一, B)，其成熟體呈桿狀，大小350-500×660-1500 nm(圖一, C)。對此菌曾進行培養試驗，但不能成功，發現此菌屬難能培養之營養苛求細菌，似絕對寄生菌。其菌體通常以出芽方式(budding)繁殖(圖二, A)，由成熟菌體母細胞芽生幼生長體，可彎曲成細長桿狀(100-250×500-2500 nm)，含濃細胞質，脫離母細胞成熟成桿狀。菌體在篩管中經篩孔移動，擠壓變形穿通篩孔，以細胞質稀薄一頭為前端而胞質高密度尾部為後端(圖二, B&C)。屬亞洲型之HLB病菌命名為*Candidatus* Liberibacter asiaticus [6, 28]。



圖一、柑桔黃龍病(HLB)特殊難養細菌(HLB-FB)之電子顯微鏡觀察。

Fig. 1. (A) Electron micrograph of Citrus Huanglongbing (HLB) fastidious bacteria (HLB-FB) packed in sieve tube of Ponkan mandarin. Large ones are mature bodies, and smaller ones are young bodies. Bar = 500 nm. (B) Electron micrograph showing cross-section of FB bodies surrounded by two-layered envelope (←), 20-25 nm thick consisting of a cell wall and inner cytoplasmic membrane (7.5 nm thick / each). (C) Serial cross sections of lateral vein from diseased Ponkan leaf (A&B), and C) a stereomicrograph of piling up with A and B sections, showing a rigid rot of nature FB body with budding (←). Bar = 500 nm.



圖二、(A) 柑桔黃龍病菌之出芽方式繁殖及細菌體貫通篩孔之情形。菌體在桶柑葉(B)及椪柑葉中(C)。

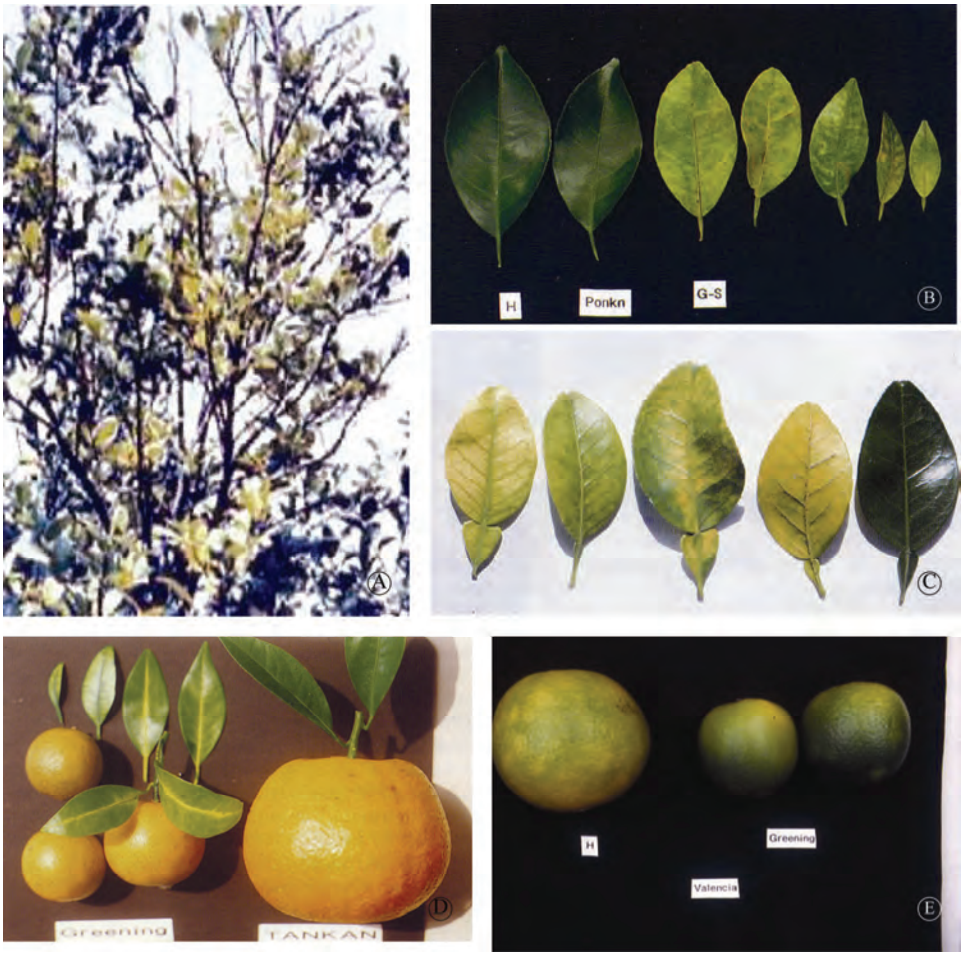
Fig. 2. (A) Side-budding (↓) (M2) of two mature bodies by producing slender rods of young daughter cell. (B) Tankan leaf, showing electron-dense posterior anterior at ention side and electron-lucent (EL) at the exit side of sieve pore. (C) Sie-pore passage (→) of FA bodies in sieve tube of disease Tankan leaf showing electron-dense posterior (ED) with dense cytoplasm at the entrance side and electron-lucent anterior.

2. 病徵

此病病徵因柑桔品種、病菌系統及環境因子等不同而略顯差異。一般病徵呈現葉脈與邊緣組織之黃化而後進展全葉變為帶淡綠斑駁之黃萎[18] (圖三, B, C)。隨老熟病葉硬化、向外捲曲而往往葉脈隆起呈木栓化，病葉提早脫落，而後新生葉變細小帶有缺鋅狀及黃萎等病徵，最終引起枝梢枯萎(圖三, A)。病株緩慢生長變矮化、異常開花包括提早開花隨後落花與落果，殘留少數果實萎縮、果皮轉黃熟不良而維持部份綠色，即所謂greening病名之由來。經病葉切片之顯微鏡觀察到韌皮部細胞之增生及其中澱粉粒堆積等內部病徵。

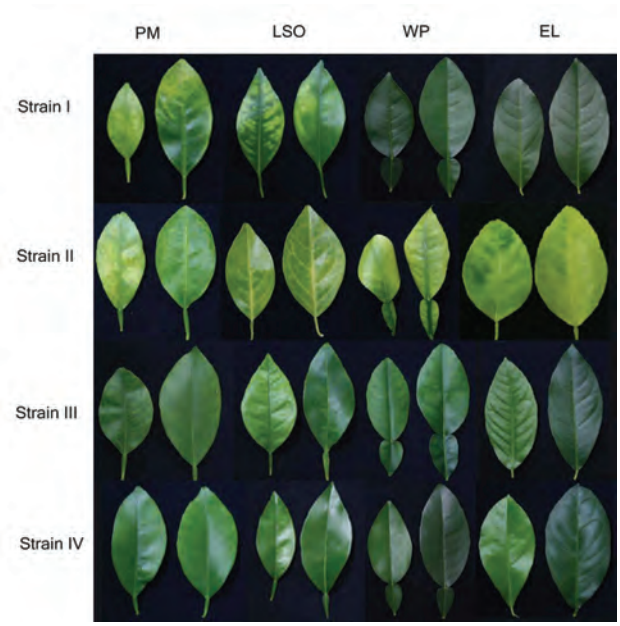
3. 黃龍病病原細菌之演化系統

柑橘黃龍病自1951年在台灣北部發生後，初期只危害國內主要柑橘品種如椪柑、桶柑、及柳橙等，1971 後開始發現感染柚類，並逐步擴及所有柑橘品種，顯示此病菌系統近幾十年來發生演化。於病原細菌的系統鑑定，以無病毒複合感染之黃龍病菌分離株，對四種鑑別柑橘品種(包括椪柑、柳橙、文旦與檸檬)進行生物檢定，根據其病原性與毒性鑑別出目前台灣田間之黃龍病菌系統至少有四種：系統 I 僅對椪柑與柳橙具高病原性並產生典型黃龍病病徵，為原始系統；系統 II 對四種鑑別品種皆具高毒性，產生典型的黃化病徵，並可快速增殖其內；系統Ⅲ 僅在椪柑與柳橙引起中度病徵，在文旦出現輕度病徵；系統 IV 為弱毒系統，僅感染椪柑及柳橙，幾無病徵表現，於PCR測定值亦輕微[4, 29] (表一, 圖四)。Tomimura, K等人(2008)將沖繩、台灣及東南亞國家的黃龍病菌分離株做分子上的親緣關係比較。分析結果發現bacteriophage-type DNA polymerase (DNA pol)的區域序列在所有的分析分離株有明顯的差異，而可區分A, B及C三群。台灣的第I型病菌系統屬於A群，第II型系統屬於B群，而沖繩的菌體分離株卻沒有DNA pol區域[28]。因此未來可參考DNA pol區域的序列設計可區分黃龍病菌系統的鑑別性引子對。



圖三、黃龍病病株之病徵(A)黃化病枝之梢枯,(B)椪柑之病葉呈現萎黃帶綠斑駁病徵,(C)柚葉之萎黃病葉呈現脈葉木栓化, (D)桶柑病果之縮果病徵, (E)柳橙之病果呈現黃熟轉色不均維持果皮綠色。

Fig. 3. (A) Severely HLB-affected trees, showing severe yellowing symptom with dieback and ultimately death of entire plants. (B) Leaf symptoms of HLB-affected Ponkan mandarin, showing bright yellowing with pale green mottling of mature leaves (center two), and newly grown small and slender leaves with interveinous chlorosis resembling zinc-deficiency symptoms (right 3). (C) Leaf symptom of diseased Wentan pummelo, showing bright-yellow mottling and vein corking on mature leaves compared with healthy leaf (right). (D) Leaf and fruit symptoms of diseased Tankan tangor, showing yellowing of veins and adjacent tissue, and smaller fruits with atrophy and pate green, compared to a healthy fruit with bright orange color (right). (E) Fruit symptoms of diseased Valencia orange, showing atrophy and poor color turning of mature fruits remaining green (right 2), compared with a healthy fruit (left).



圖四、柑桔黃龍病菌系統在四種不同柑桔上造成不同病徵及罹病程度。

Fig. 4. Different type and severities of the symptoms induced by the 4 HLBB strains (I~IV) in four differential citrus cultivars of Ponkan mandarin (PM), Liucheng sweet orange (LSO), Wentan pummelo (WP) and Eureka lemon (EL) under greenhouse conditions during 2005~2006.

表一、黃龍病系統及病原性特徵以病徵級數與 PCR 測定值表示

Table 1. The pathogenicity characterization of HLB-FB isolates according to disease index and PCR detection of HLB-FB infection

Strain	Differential cultivars of citrus[a]			
	PM	LSO	WP	EL
I	3 /+++[a]	3 / +++	0 / -	0 / -
II	3 / +++	3 / +++	3 / +++	3 / +++
III	2 / ++	2 / ++	1 / +	0 / -
IV	0 / +	0 / +	0 / -	0 / -

[a] Disease index / PCR index. Disease index was graded 12 months after inoculation: 0, healthy looking without symptoms; 1, mild chlorotic symptoms; 2, intermediate symptoms including chlorosis, mottling with intermediate dwarfing; 3, typical greening symptoms including leaf yellow mottle and curling, vein-yellowing with distinct dwarfing. PCR index, pixel value (density count) of the HLB-FB-specific band on agarose gel electrophoresis: -, pixel value< 50; +, 50 ~ <110; ++, 110 ~ < 170; +++, 170 ~ < 230. Differential cultivars were Ponkan mandarin (PM), Liucheng sweet orange (LSO), Wentan pummelo (WP) and Eureka lemon (EL).

病菌之傳播與中間寄主

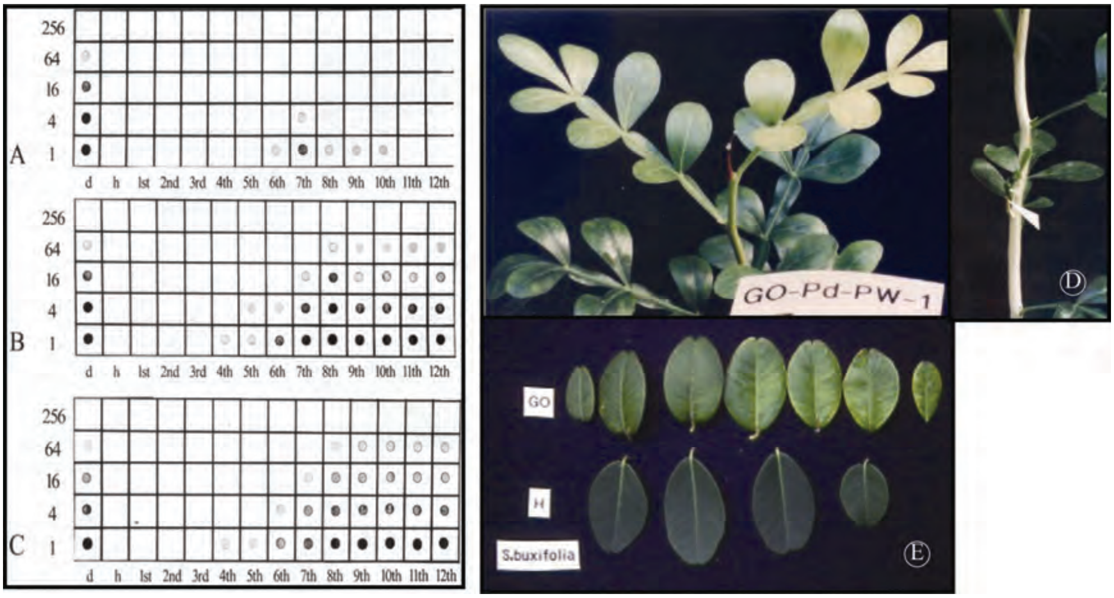
1. 病苗之傳播

此系統性黃龍病主要經無性繁殖之柑桔種苗由人為移動而傳播，而在田間由柑桔木蝨(*Diaphorina citrus*)做永續性之傳染蔓延。台灣的木蝨生態型(Biotype)對黃龍病菌傳播力較低，其成蟲木蝨在罹病柑株上獲毒，傳播率為低於 5%而帶毒蟲之傳染力亦低於 12.9%。成蟲在病株之獲毒吸汁時間往往超過一天，且若蟲之獲毒率較高。此媒介昆蟲不經卵傳播[1, 19]。用帶病之接穗嫁接繁殖之柑苗，或由染病之母株經高壓繁殖之苗為主要傳播途徑，做長短距離傳播。

2. 中間寄主

柑桔黃龍病除了危害柑桔之外，其他可能性的中間寄主亦成為田間發病生態的注意焦點。因此有四種柑桔木蝨繁殖良好的植物被引起注意，包括烏柑仔(*Severinia buxifolia*)、木蘋果（*Limonia acidissima*）、月橘(*Murraya paniculata* var. *paniculata*)及咖哩葉(*Murraya koenigii*)。將罹病柑株之病芽以人工接種至四種植物上，再以核酸探針點漬雜配法追蹤偵測病菌的存在，發現烏柑仔及木蘋果經人工接種後可偵測到病菌的存在，但月桔及咖哩葉在病原接種後的一年皆無法被偵測到。木蘋果以人工接種病原後在六至十個月期間可偵測到病菌，之後(十一及十二月)即無法偵測到病菌，而其中僅在接種後七個月時病菌濃度為較高(圖五, A)，和病原接種於晚崙西亞甜橙的植株相比，木蘋果中的病原菌僅以低量存在(圖五, A&C)。病原接種六個月後可在植株上觀察到黃化的病徵(圖五, D)，但在一年後植株即回復健康狀。木蘋果中的病原菌因無法長期持續性存在，進入感染數月後又消失，認定為黃龍病暫時性寄主[13, 14]。而病原菌接種於烏柑仔的試驗和接種於晚崙西亞甜橙植株的感染情形相似(圖五, B&C)，在烏柑仔及晚崙西亞甜橙中病原接種四個月後即可偵測到病原菌，且病原濃度較高、病原菌可持續性存在而感染危害植株，在接種後可見烏柑仔有黃化病徵出現(圖五, E)相似於在柑桔上的病徵，因此得知烏柑仔為黃龍病菌良好的寄主[15]。月橘及咖哩葉雖是木蝨生殖最喜好的

寄主，但以核酸探針點漬雜配法及黃龍病專一性引子對(226-primer pair)進行PCR皆無正反應訊號出現[2,4]。顯示台灣之黃龍病菌不會在月桔及咖哩葉繁殖，並非柑桔黃龍病原菌之中間寄主。

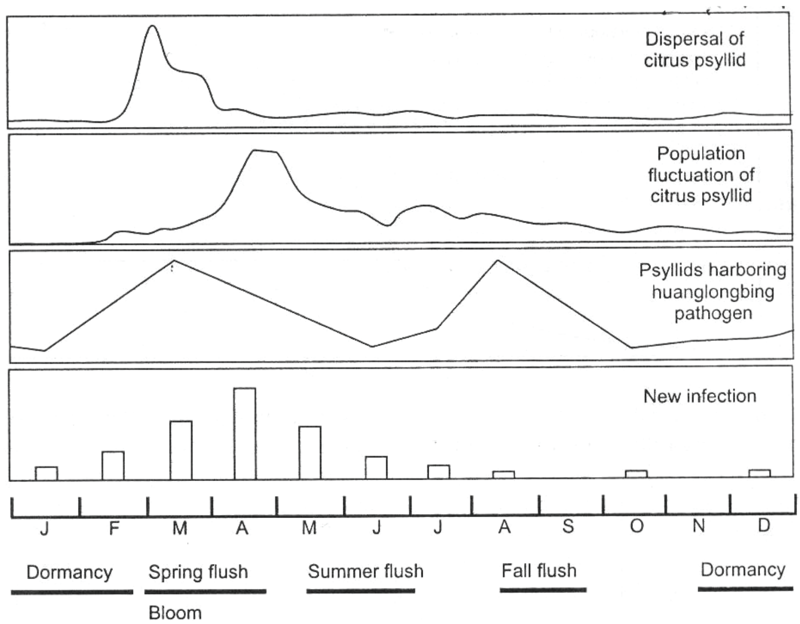


圖五、黃龍病菌在不同中間寄主及甜橙中因抗感性不同之菌體繁殖情況。以點漬雜配法測定病菌繁殖濃度在接種後一年之變動。

Fig. 5. Dot hybridization tests for the detection of HLB-FB in suspected alternative hosts grafted with the HLB-diseased citrus scions, were made monthly within 1 year after inoculation. The total nucleic acid extracted from the test plants of wood apple (A), Chinese box orange (B), and Valencia sweet orange (C) were diluted in four-fold dilution series, and then subjected to dot hybridization. (D) The symptom expression of wood apple (*Limonia acidissima*) graft-inoculated with diseased Ponkan scion. (E) Leaf symptoms of HLB-affected Chinese box orange (*Severinia buxifolia*), alternative host of HLB, showing yellow mottling and hardening of diseased leaves (GO, upper row), compared to healthy green leaves (H, under row).

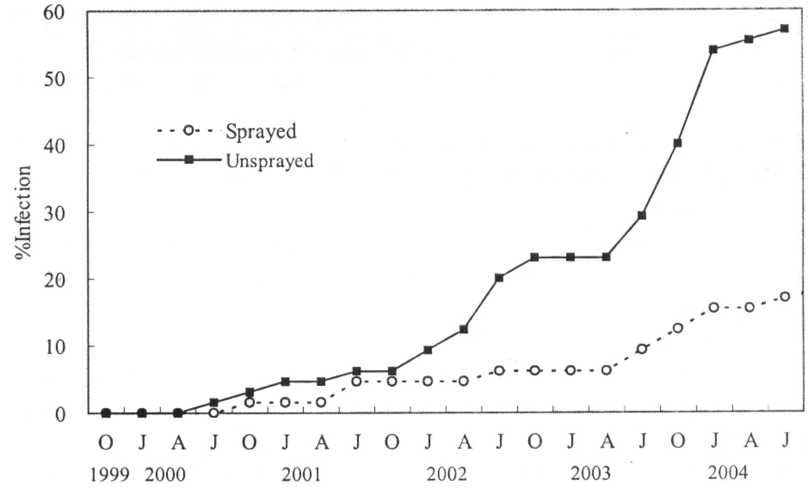
3. 媒介昆蟲之傳播生態

為防阻此病之蔓延，從1983年無病柑桔種苗之生產與栽培就開始推展。健康苗種植於田間後必需防驅木蝨來防阻黃龍病之田間傳播[22, 23]。當傳染源存在而媒介昆蟲密度高時此病傳染流行就發生。病害在田間之蔓延在萌芽期最高，因幼芽供木蝨之取食、繁殖、獲毒與傳播[1]。此病由木蝨之傳播與媒介昆蟲之高密度、帶毒率及遷移飛來量等有正相關[1]。HLB病株群附近之果園中柑桔健樹被傳染發病率增加成S形曲線。以二個月發病潛伏期推最高感染率於嘉義地區為二月下旬至三月中旬，此期間木蝨帶毒率及飛來木蝨之量為高峰期(圖六)。此期間為施藥防驅木蝨之關鍵期。在不施藥防蟲及不掘除病株之果園中柑株感染發病率二年累積達70％。在1999至2004之五年間在南台灣進行黃龍病之傳染率增展試驗，在施藥防蟲試驗區感染率17％，而不施藥區感病達57％(圖七)。



圖六、柑桔木蝨在南台灣果園中傳播柑桔黃龍病之周年情況。

Fig. 6. Phenological patterns, population dynamic and HLBB infection of citrus psyllid in orchards of Southern Taiwan: Dispersal of citrus psyllid, population fluctuation of psyllid, psyllids harboring HLBB and new infection. (Hung, S. C., 2006)



圖七、五年間在噴藥及不噴藥柑園中之黃龍病感染率累積情形。

Fig. 7. HLB progresses of infection rate (％) in sprayed and unsprayed plots during 5 years. The infection cumulative rate of FB infection reached 17％ in sprayed plot and 57％ in unsprayed put a 5 years later. (Hung, S. C., 2006)

病害診斷與病菌偵測

1. 病害診斷

在果園之病株通常按上述之典型病徵特徵診斷黃龍病。根部病害、天牛為害及肥份營養缺乏等亦引起葉片萎黃病徵，因此需先察看是否此類病蟲害加害。進一步診斷使用罹病性之寬皮柑(如椪柑)或桔橙(如桶柑)等健苗為指示植物，採可疑株之枝條做接穗/芽嫁接接種指示植物，培養於溫室中觀察其發病病徵。病菌在柑株中分佈很不均而密度又低，因此對一樣品需用 2 株以上指示植物，而且一株上要嫁接穗/芽 2 個以上，此生物檢定法頗費時[19]。電顯觀察病組織切片篩管中之病菌體，可確認此病感染[3]。病葉葉肉細胞中澱粉堆積現象，因此可用碘液試劑檢驗病葉係田間快速檢疫法，但敏感度比 PCR 偵測法低。

2. 病菌檢疫偵測

黃龍病於田間主要是以病株葉片與果實的病徵作為判別，進一步的診斷則需將病接穗嫁接於感病的柑株進行生物檢定。由於病原菌於植物

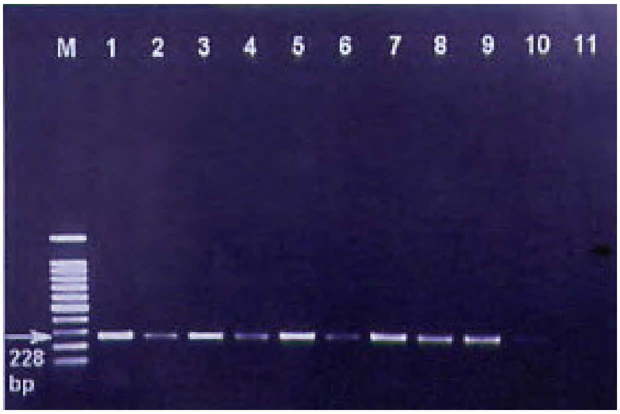
體內常濃度低且分布不均，因此生物檢定需使用較多的試驗植物。嫁接接種經一段時間後再以超薄切片配合電子顯微鏡觀察確認接種植物的韌皮部篩管細胞內是否有病原菌存在，相當耗時費工。因此為能快速診斷，進而開發分子診斷試劑，經病菌基因DNA選殖，獲得具病菌特異性DNA片段，而可成為一非放射性標誌之核酸探針(DNA probe)，再經點漬雜配法測定黃龍病感染與否[2, 14]。而後為更靈敏且快速診斷黃龍病，更進一步將此探針經定序後，從中設計專一性引子(226-primer pair)[2, 13]，建立PCR測定法，配合電泳分析結果。而此專一性引子對國外亞洲型的黃龍病菌分離株亦具反應，包括日本沖繩、中國、馬來西亞、越南、泰國之分離株。而此PCR技術已發展至可偵測黃龍病之寄主植物與媒介昆蟲木蝨[12]，成功應用於病菌偵測與生態的研究，成為快速準確檢疫技術(圖八)。此外PCR測定法也應用於健康種苗生產的檢測。除此之外，由於從電子顯微鏡觀察研究發現受黃龍病菌感染的病組織之葉肉細胞及韌皮部之薄壁細胞皆有澱粉粒之堆積，因此此一特性亦可利用於此病害診斷，而再創製碘液簡易檢疫法檢測黃龍病，並完成簡易的HLB碘試劑檢測套組(Iodine kit)，並標準化(圖九)：以粗細度160~200C之砂紙片削取成熟葉上表面組織，放入PE封口袋，加1cc純水，揉成suspension，再加入1~2滴碘液 (KI 3%+I_2 1.5%)，即呈紫黑色反應，1分鐘內完成反應，目讀檢驗結果，此法廉價簡便，農民易使用，而可於田間進行初步診斷。

黃龍病之健康管理

1. 無病柑桔種苗之體系建立與生產

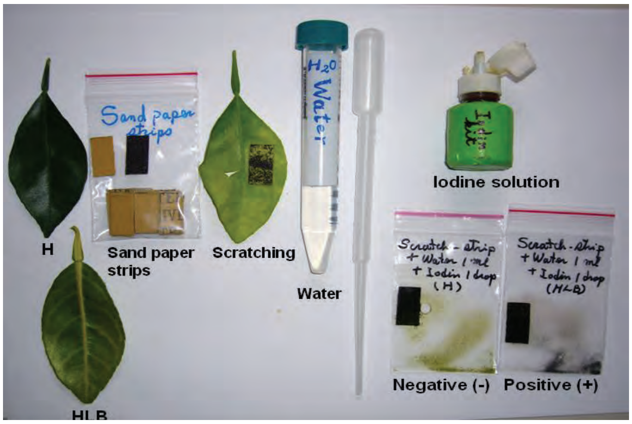
柑桔黃龍病之發生流行於熱帶、亞熱帶地區，現今對柑桔生產構成嚴重威脅。因系統性黃龍病及病毒病害主要由營養繁殖體傳播而在田間經媒介昆蟲迅速傳染蔓延，綜合病害管理(IPM)被推薦於防治此類病害。IPM 包括無病柑苗之繁殖，傳染源之撲滅以及經媒介昆蟲之驅除來預防第二次傳染。無病柑桔種苗體系之建立(PFNS)對此病發生之預防是重要基本措施，在台灣從 1983 起開始著手推展。改進頂梢微體嫁接法(STG)

併用熱療法用於生產無病柑桔原種。精確而快速檢疫技術之研發對無病種苗體系之管理是不可或缺。在台灣 PFNS 包括下列階段：1)STG，2)無病柑桔原種之建立，3)無病柑苗繁殖圃，4)種苗健康驗証制度經檢疫措施執行。PFNS 及健康種苗驗証措施推行目前經台灣大學植微系、嘉義農業試驗分所以及農委會防檢局分工合作推展。



圖八、黃龍病菌之 PCR 偵測，以電泳膠體分析之結果。

Fig. 8. Detection of HLB pathogen by polymerase chain reaction (PCR) followed with electrophoresis analysis: 1~4, Taiwan HLBB isolates; 5, Okinawa isolate, Japan; 6, Chain isolate; 7, Malaysia isolate; 8, Vietnam isolate; 9, Thailand isolate; 10, Saudi Arabia isolate; 11, Healthy CK.



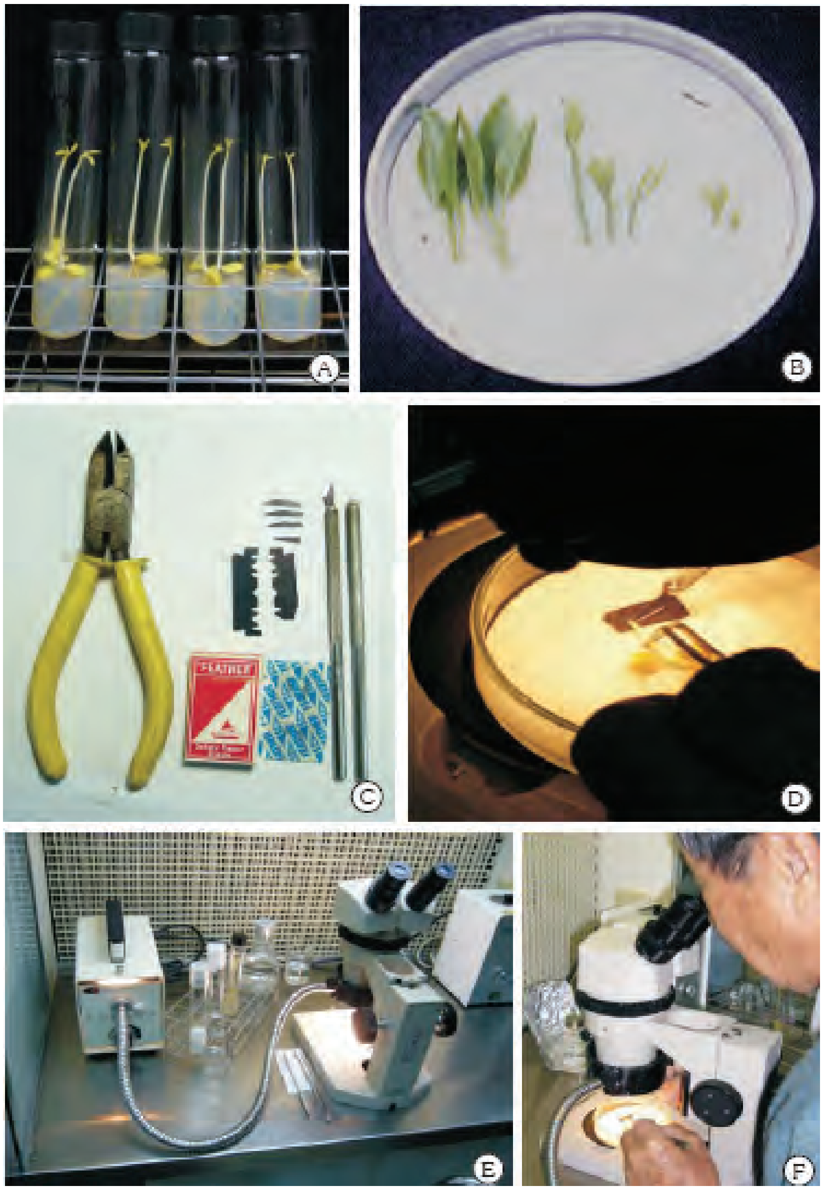
圖九、黃龍病菌之碘液試劑檢疫方法。

Fig. 9. Indexing of HLB infection with Iodine kit including Iodine solution, piece of sand paper, PE bag and pure water: Positive reaction (+) showing color turning to dark brown to black; Negative reaction (-) showing yellow.

1) 頂梢微體嫁接(STG)與無病柑桔原種圃

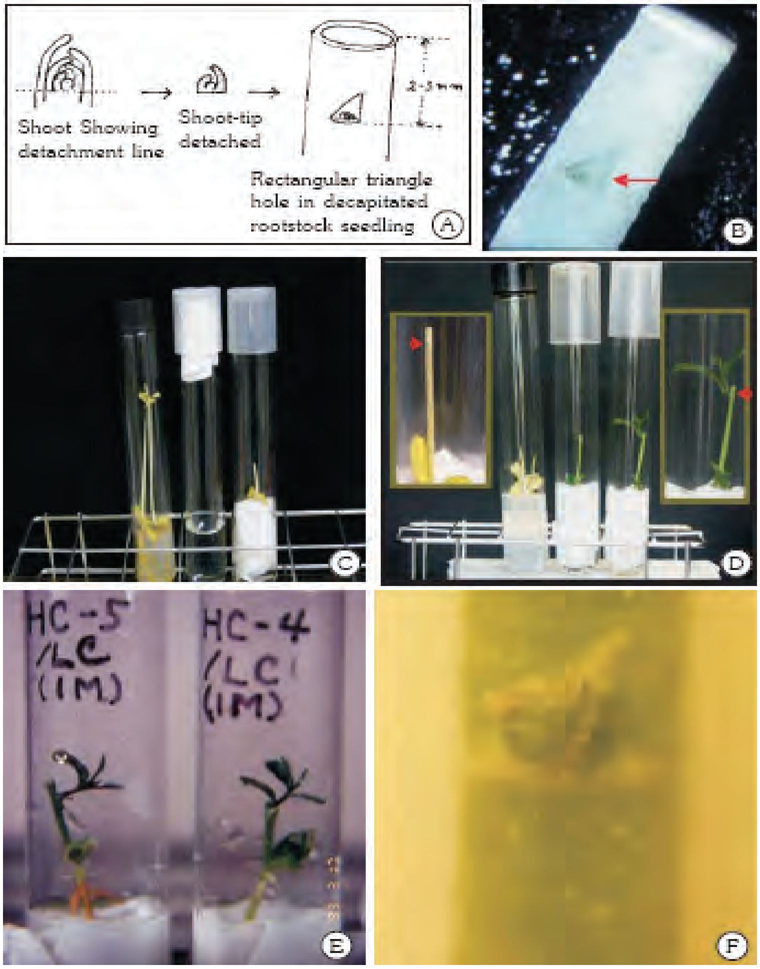
STG 法是從帶病柑桔母樹枝條獲得無病繁殖體之最可靠方法。幼芽頂梢或腋芽生長點組織通常不帶 HLB 病菌與病毒類，而由頂梢生長點組織再生植株通常不含此系統性病原。由一般 STG 法[21]將其倒 T 形嫁接切口修改為直角三角形小穴而為改進 STG 法，可提高 STG 成功率[25]。STG 之操作過程在無菌箱內進行，所用工具及材料(圖十)以及改進 STG 法過程(圖十一)詳細解說記載於作者最近著作小冊[23]。雙層嫁接法開發於促進 STG 株之嫁接生長點組織快速生長，其操作技術過程簡述於下(圖十二)。(1)STG 嫁接苗在 28℃生長箱培育一個半月左右嫁接生長點組織在白化砧苗之三角穴中癒合完成或開始生長後取出試管外，其嫁接上端 1 公分左右切斷供做接穗。(2)將此幼接穗旁接於預先培育於鉢中生長好之砧木苗，嫁接用蠟薄條包綁幼 STG 接穗下部，露出嫁接穴，上端用 PE 小封口袋覆蓋預防嫁接穗乾枯。(3)雙層嫁接株可置放於 28℃生長箱或溫室中培育 3-4 星期後移開 PE 袋，約 3-4 個月後 STG 生長點組織生長出新芽發育成新枝條，經 PCR 檢疫確定無病者，可供做接穗枝條做進一步嫁接繁殖。(4)無病 STG 苗與雙層嫁接苗其生長枝條每隔 3-4 月可供為快速繁殖之嫁接用接穗。

STG 苗經檢驗確定不含 HLBB 及 CTV, CTLV 及 CEVd 等病菌者可供為無病原種株，保存於無病原種圃，設立於嘉義農業試驗分所。原種圃設在不銹鋼網建構之防蟲網室中。該網室具有防蟲侵入雙層門，外圍由水溝環圍(圖十三, A, B&C)。在第一門上裝有電風簾以阻擋昆蟲隨人侵入。室設水泥台於覆蓋粗碎石地板上，走道為水泥路(圖十三, D&E)。原種株通常嫁接於枳橙砧上(Troyer, Carrizo)，每品種保存有 2~4 株。原種株培育於大鉢介質土中，適當剪定促使小量結果，觀察品種園藝特性之變異與遺傳穩定性。淘汰 off-type 變異株。原種株之枝條供為接穗株之繁殖培育。原種株受定期檢疫而檢查果實之正常性。柑桔原種保存於公立試驗或學術機構、防蟲網室或溫室中，國家無病柑桔原種圃設在嘉義農業試驗分所溪口站水田區中。



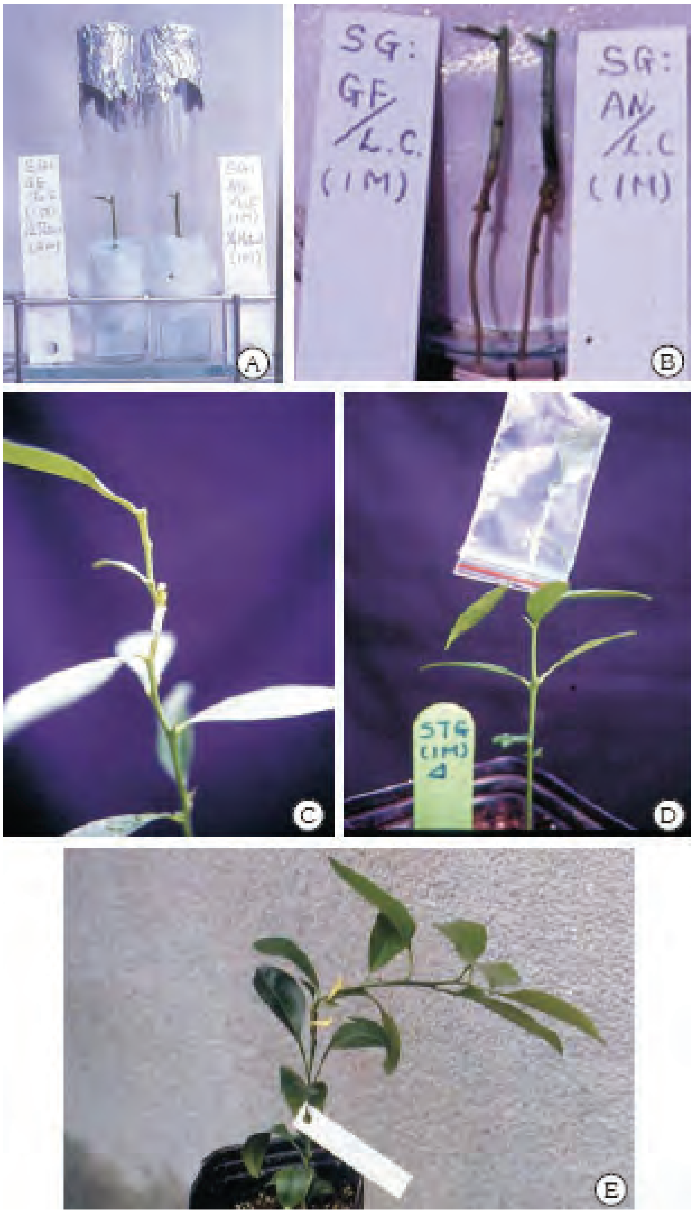
圖十、頂梢微體嫁接之過程：材料與工具。

Fig. 10. Procedure of shoot-tip micrografting. (A) Culture of rootstock in solid medium. (B) Citrus shoots of different sizes for STG. (C) Cutting knife consists of cutting edge of razor blade and edge holder; pliers for making blade edge. (D) Making STG incision on upper top of rootstock seedling with tip-bended forceps and cutting knife. (E) Cold beam illuminator, binocular microscope and accessories within a laminar-flow bench. (F) Making STG incision on upper top of rootstock seedling with tip-bended forceps and cutting knife.



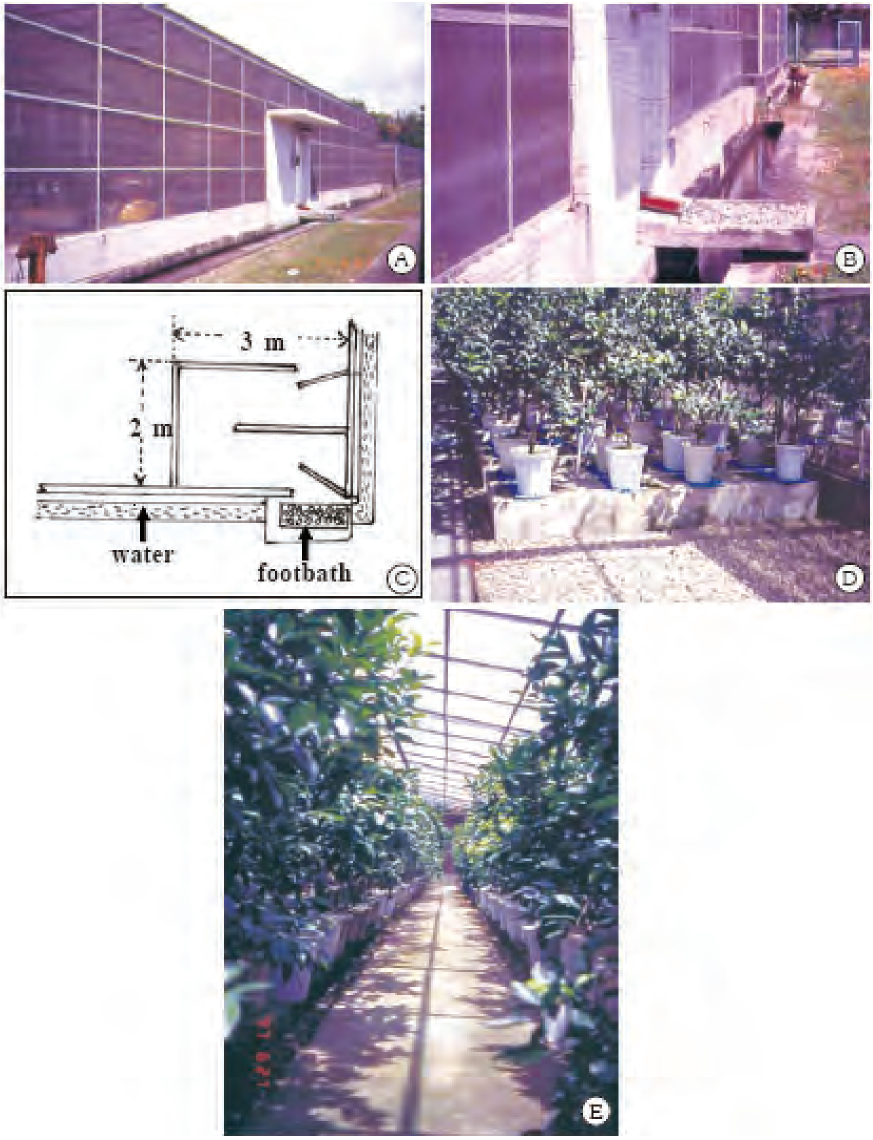
圖十一、頂梢微體嫁接之過程：白化苗與嫁接苗培養，直角三角穴之STG過程圖解。

Fig. 11. Procedure for shoot-tip micrografting. (A) Diagram showing excision of shoot-tip with 2-leaf primordia and rectangular triangle hole (0.3~0.5 mm) on a decapitated rootstock seedling by removing cortex layer with cutting edge of STG knife. (B) A shoot tip placed in the hole on a decapitated rootstock seedling. (C) Two-week old rootstock seedlings in solid medium (left), a sterile test tube with a center-perforated filter-paper platform containing liquid medium (center), and a test tube containing the micrografted rootstock seedling supported by filter paper platform on liquid medium (right). (D) Different stages of STG rootstock seedlings, also showing a new sprout regenerated from the grafted shoot-tip (right). (E) Two new shoots of Hong China sweet orange regenerated from ST in rectangular hole (left) and in V-shaped incision (right) of rootstock seedlings one month after micrografting. (F) A new sprout from ST in rectangular hole on rootstock.



圖十二、STG苗之雙層嫁接法以加速嫁接芽之萌芽與生長。

Fig. 12. Procedure of double grafting with micrografted rootstock seedlings as scion. (A) Sprouting of micrografted seedlings in test-tube culture. (B) Two STG seedlings with sprouts taken out from test tubes for secondary grafting. (C) A potted vigorous rootstock seedling side-grafted with a scion from the STG-seedling. (D) The grafted part of rootstock seedling covered with a mouth-sealed plastic bug. (E) A new mature twig grown from the double grafted rootstock three months after double grafting.



圖十三、國家無病柑桔原種圃網室之結構。

Fig. 13. National repository for maintaining certified pathogen-free citrus foundation blocks. (A) Insect-proof screen-house surrounded by water canal and with double doors. (B) Close-up picture of the entrance with double doors. (C) Drawing of an entrance with double door and footbath containing gravel mixed with copper sulfate solution. (D) Inside view of the screen-house showing healthy foundation trees on concrete benches on gravel floor. (E) Certified budwood increase trees grown in a screen-house attached to the foundation depository.

2) 無病柑桔苗之生產與驗証

柑桔黃龍病在全台低海拔及平地柑桔果園一直普遍發生危害，唯以無病柑苗更新病園才可更生台灣柑桔產業。更種無病苗而推行適宜健康與栽培管理，可望促進永續柑桔產業之發展。因此生產與栽培無病而高品質之柑苗對 HLB 管理係首要基本對策。至今國內生產無病柑苗產量減少，不達所需要量之一成。無病柑苗生產事業之推展與檢驗管理期待促進。

無病苗生產之基本無病種圃完善建立已久，目前由嘉義分所之接穗培質株圃提供無病接穗尚不夠量。由民間合格無病苗圃設立無病接穗繁殖苗室，從無病原種提供種原，其採穗使用期限限定五年，之後得用原種更新。農委會防檢局於 2004 年 12 月 31 日公佈「柑桔無特定病蟲害驗証作業須知」，法令規範無病柑桔種苗之無病原種、繁殖苗及無病苗之生產及檢疫檢驗辦法，並規定檢疫流程與方法，由此法規定設立民間無病苗圃(圖十四)按辦法生產無病苗，受定期檢疫輔導，無病苗出貨前需經抽檢、檢疫合格後發行驗証合格証貼標始得出售。

無病苗以介質植鉢生產。健康砧木苗在網室內生產。砧木苗栽育在含消毒過介質土之苗管(徑 5 ×高 18 cm)或育苗槽中，砧木苗達 30 公分左右移植到內含消毒介質土之打孔塑膠袋內(徑 10×高 30 cm)，苗高超 40 公分可供嫁接，嫁接方法可參考快速繁殖嫁接法[23]。使用美工刀嫁接無病芽或穗，以芽接或旁接法(side-graft)，於砧木苗距土面 25-30 公分處嫁接，用蠟膜帶裹綁芽/穗，在接點上接芽方向反折，待芽穗萌芽超出 5 公分後由接點上方剪除砧木莖，並時常巡視摘除腋芽以促進接穗萌長。在肥培管理良好下芽接 3-4 個月後苗高可達 50 公分以上，可出貨田間定植。在育苗中注意疫病、根瘤線蟲及潰瘍病之發生，而嚴格防阻媒介昆蟲之侵入。砧木品種之選擇要注意穗砧之親和力與抗病性。一般酸桔及美人柑用於寬皮柑，Troyer 及 Carrizo 接於橙類及寬皮柑；苦柚及 Swingle 枳柚用於柚類。廣東檸檬及 Volkamer 砧常用於各種柑桔類。

圖十四、柑桔無病苗圃網室，無病砧木苗及嫁接苗之鉢植栽培。

Fig. 14. Production of PF citrus seedlings in screen houses by private nurseries. (A) Cultivation of rootstock seedlings in seedling tubes (arrow), the secondary transplanting in large plastic containers (upper left plants), and budded plants prepared by grafting clean bud or scion onto rootstock seedlings (right). (B) A well-grown budded nursery plant in container, ready for transplanting to the field.

圖十五、無病柑桔苗種植於田間果園後良好之發育與結果。

Fig. 15. Rehabilitation of citrus orchards planted with PF seedlings.
Cultivation of pathogen-free pummelo seedling (A) and Ponkan mandarin seedlings (B) in orchard. Two-year-old PF Wentan pummelo and Ponkan tree began fruiting. Dr. Garnsey and author stand by Ponkan tree in the center (B). (C) Luxuriant growth of 3-year-old sweet orange trees in an orchard planted with PF seedlings. (D) Normal bearing of fruits of high yield on the 3-year-old PF trees in the orchard as shown in the picture (D) with the author and grower.

2. 無病柑桔苗之種植與健康管理

為防治黃龍病與病毒病害，推行無病柑苗來更新生產。無病苗種植田間後比一般柑苗生長快而種植後 2 年開始結果達相當量且品質良好，若做適宜之健康管理及肥培管理，例如適宜之灌溉水，施肥與剪定(圖十五)。至今無病苗之推廣不夠普及，今後仍待公家與民間合力推廣獎勵。至於無病苗種植果園後需勵行下列策略與健康管理：

1) 傳染源之撲滅：隨時掘除 HLB 病株及中間寄主植物以避免此傳染源經媒介昆蟲傳播到鄰近之健康柑樹。
2) 媒介昆蟲驅除：施用殺蟲劑於柑樹保護防阻媒介昆蟲傳病感染。可在萌芽期即傳病危險期(2-3 月)噴施適當殺蟲劑(例如大滅松, Confidor)以防驅木蝨與蚜蟲。已引進之木蝨天敵寄生峰(*Tamarixia radiate*)定著於本島，生物防治木蝨已達效果。
3) 果園隔離：果園周圍種植防風林對隔離媒介昆蟲飛進園內有所助益。將果園設立於遠離疫區之新地區亦有隔絕效果。
4) 病株之抗生素灌注藥療：於田間病株的化學療法上，部份柑橘生產者曾以 1976 年(Su 與 Chang)所報告的方法灌注四環黴素以治療病株。近來灌注效率則可以加壓灌注器(圖十六)取代早期重力點滴法獲得改進，抗生素灌注之方法程序與注意事項列於表二。於灌注器內加入高壓 (壓縮空氣)在 80 磅下，灌注 1000 ppm 之四環黴素(2~4 公升/每棵) 3 次(秋 2 次，春 1 次)，可達良好藥療效果，處理後病株長出健康新生葉，產生好品質柑果[4]。注射後，剪定頂梢枯枝可增進治療效果。此法常引起暫時性藥害包括葉片焦枯、葉脈褐化、大量落葉與新生葉細長，但可於半年之後恢復正常生長[4]。此治療法建議病株於發病早期(病葉比率占樹冠一半以下)處理。

於2004年3月HLB初發現於巴西聖保羅兩農場，到2006年10月，2年半間此病蔓延到3000個農場中65萬株柑樹，可見傳播速度之迅速。當時也發現月桔被HLB感染也能做傳染源。從2005年7月起該國法令執行掘除柑桔病株[16]。至2009年11月，5年半內有200萬株柑樹檢查到感染此病，因此掘除周邊之罹病柑樹共砍除400萬株。該國體驗此事實認定HLB管理有下列二原

則：(1)傳染源之撲滅，HLB病株之隨時掘除,(2)殺蟲劑之噴灑防驅媒介昆蟲木蝨，HLB能以此二原則來防治[5]。此對策原則可供吾方參考。

圖十六、抗生素之灌注藥療：工具與壓力灌注。

Fig. 16. Chemotherapy of HLB-diseased citrus tree by antibiotic injection. (A) Injection of 1~4 L of 1000 ppm Achromycin with a air-pressured injector to the basal portion of trunk. (B) A cordless battery-driving drill (Bosch), and a wood-type needle for drilling injecting hole. (C) Diagram of air-pressured plastic injector.

表二、抗生素灌注之方法程序與注意事項

Table 2.Antibiotic injection schedules and cautious

A. Formula:

(1) 1000 ppm of Achromycin (Tetracycline) :
1 g Achromycin in 1 litter clean water

(2) 1000k IU of Penicillin-G :
2 bottles of Pencillin-G (1,500,000 IU) in 3 litters of clean water.

B. Dosage of antibiotic solution:

Diameter of trunk (cm)	<10	11~20	21~30	>31
Volume of solution (L)	1	2	3	4

C. Application cycles:

(1) 2 applications of Achromycin solution at 2~3 weeks interval after fruit harvest (mainly in early spring in Taiwan)

(2) 1 application of Achromycin followed by 1 application of Penicillin-G at 2 week interval.

(3) 2 applications of Achromycin followed by 1 application of Penicillin-G at 2 week interval.

D. Site of injection:

Injection holes of 3 cm deep, are made at 10~20 cm from soil level on the swelling site of trunk on diseased-branch side.

E. Cautions of injection:

(1) Injection is made in the forenoon of sun-shining day.

(2) Irrigation of water has to be done just after injection in dry soil.

(3) Pruning off the diseased twigs or branches 1 week after the last injection.

(4) Injection pressure within an injector at 80 lbs.

(5) Treatment of injection hole with pruning protectant paint e.g. wound paste (Topsin M) or sick solution of copper oxychloride + metalaxyl (100X).

(6) A injection recommended for curing HLB-diseased trees at early stage of disease (<50％ diseased twig).

(7) Injection time : just before sprouting time or after harvest (spring , autumn).

結論與展望

柑桔黃龍病起因於不能培養之特殊細菌，係系統性似病毒病害，主要經種苗傳播，在田間由木蝨傳播蔓延，易流行發生成災。此病通常以綜合防治法防治。無病種苗之生產體制建立係首要對策。病菌偵測技術已建立，對無病種苗之檢疫及健康管理有助益。吾國無病種苗生產與驗証制度早已建立完成，唯未普及推行，無病苗對HLB管理及產業更新尚未成效。無病苗定植後田間健康管理仍待改進與推行。其中病株傳染源之撲滅需要徹底執行，而媒介木蝨之藥劑驅除對此病之防治亦是基本原則。今後此病之進一步流行病學研究可供為HLB管理改進之依據。至今尚未發現具有此病的抗性品種，仍待今後遺傳工程或一般育種育成抗病性品種，以抵擋柑桔黃龍病之侵襲。

謝　　辭

本文作者非常感謝曾經參與柑桔黃龍病及相關研究的學生，共同辛苦努力的成果得以有些學術上貢獻，亦應用於台灣柑桔的產業改進，本文主要引用其綜合研究成果。參與研究者包括千貞旭博士(頂稍微體嫁接改進法)；黃安利博士(黃龍病菌電子顯微鏡觀察)；蔡美珍博士(柑桔萎縮病毒之單元抗體製備)；洪挺軒博士(黃龍病菌之偵測)；洪士程博士(媒介昆蟲柑桔木蝨之媒介特性及傳播生態研究)；蔡佳欣博士(黃龍病菌系統與發生生態及抗生素藥療研究)以及馮雅智小姐(黃龍病菌系統之生態與分子鑑定)。至於無病種苗體制之建立與推行受嘉義農試分所同仁與所長之協助與合作甚多，在此表示謝忱。

引用文獻

1. 洪士程 2006 柑橘木蝨傳播黃龍病之生態研究。台灣大學昆蟲學研究所 博士論文。164 頁。
2. 洪挺軒 1994 柑橘黃龍病原擬細菌診斷用核酸探針之製備與應用於感

染生態之研究。台灣大學植物病蟲害研究所 博士論文。258 頁。

3. 黃安利 1987 柑橘立枯病原菌之形態與消長動態之電顯研究。台灣大學植物病蟲害研究所 博士論文。148 頁。
4. 蔡佳欣 2007 柑橘黃龍病之病菌系統、發病生態與化學治療。台灣大學植物病理與微生物學研究所 博士論文。150 頁。
5. Belasque Jr, J. *et al*. 2010. Lessons from Huanglongbing management in Sao Paulo state, Brazil. Journal of Plant Pathology 92:285-302.
6. Bové, J. M. 2006. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging century-old disease of citrus. J. Plant Pathol. 88:7-37.
7. Calavan, E. C. 1968. A review of stubborn ad greening diseases of citrus PP. 105-117. In J. F. L. Childs (ed), Proc. 4th Conf. IOCV University of Florida Press, Gaines ville.
8. Cheng, C. P. 1943. Studies on 'Huanglongbing' of Chaukan tangor. Jour. New Agr. 3:142-172 (In Chinese).
9. Chien, C. C., Chiu, S. C. and Ku, S. C. 1989. Biological control of *Diaphorina citri* in Taiwan. Fruit 44: 401-407.
10. Etienne, J. and Aubert, B. 1980. Biological control of psyllid vectors of greening disease or Reunion island. PP. 118-121. In Calavan, E. C., S. M. Garnsey and L. W. Timmer. (eds.) Proc. 8th Conference of IOCV, University of California, Riverside.
11. Hamashima, A. *et al.*, 2003. First report of citrus greening disease in Kagoshima. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 69: 307-308.
12. Hung, T. H., Hung, S. C., Chen, C. N., Hsu, M. H. and Su, H. J. 2004. Detection by PCR of *Candidatus* Liberibacter asiaticus, the bacterium causing citrus huanglongbing in vector psyllids: application to the study of vector-pathogen relationships. Plant Pathology 53: 96-102.
13. Hung, T. H., Wu, M. L. and Su, H. J. 1999. Development of a rapid method for the diagnosis of citrus greening disease using the polymerase chain reaction. J. Phytopathology 147, 599-604.

14. Hung, T. H., Wu, M. L. and Su, H. J. 2000. Identification of alternative hosts of the fastidious bacterium causing citrus greening disease. J. Phytopathology 148, 321-326.
15. Hung, T. H., Wu, M. L. and Su, H. J. 2001. Identification of the Chinese box orange (*Severinia buxifolia*) as an alternative host of the bacterium causing citrus Huanglongbing. European Journal of Plant Pathology 107: 183-189.
16. Lopes, S. A. 2006. Huanglongbing in Brazil. PP.11-19. Intern. Workshop: Prevention of Citrus Greening Disease in Severely Infected Areas. TARRI JIRCAS, Ishigaki, Japan.
17. Lopes, S. A., Bassanezi, R. B., J. Belasque, Jr., Yamamoto, P. T. 2008. Management of citrus Huanglongbing in the State of Sao Paulo-Brazil. PP. 107-117. Proc. FFTC-PPRI-NIFTS Joint Workshop: Management of Citrus Greening and Virus Disease for Rehabilitation of Citrus Industry in the ASPAC. Hanoi, Vietnam.
18. Matsumoto, T., Su, H. J. and Lo, T. T. 1968. Likubin. PP 63-67. In USA Agriculture Handbook No. 333. Indexing Procedures for 15 Virus Disease of Citrus Trees.
19. Matsumoto, T., Wang, M. C. and Su, H. J. 1961. Studies on Likubin. In W. C. Price (ed.) Proc. 2nd Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV). University of Florida Press. Gainesville. PP. 121-125.
20. Miyakawa, T. and Tsuno. 1989. Occurrence of citrus greening disease in the Southern islands of Japan Annals Phytopathological Society of Japan. 55:667-670.
21. Murashige, T., Bitters, W. P., Rangan, T. S., Roistacher, C. N. and Holliday, B. P. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. HortScience 7:118-119.
22. Su, H. J. 2006. The current measures and perspective of controlling citrus

greening disease (HLB) in Taiwan (Abstract) P30 Proc. The International Workshop for Prevention of Citrus Greening Disease in Severely Infested Areas. Dec. 2006, TARF/JRCAS, Ishigaki, Japan.

23. Su, H. J. 2008. Production and Cultivation of free Citrus Saplings for Citrus Rehabilitation in Taiwan. pp 51. Published by Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology and Asia Pacific Association of Agricultural Research Institutions (APAARI) C/O FAO Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand.
24. Su, H. J. 2008. Research and health management of citrus Huanglongbing in Taiwan. PP. 57-92. Proc. International Research Conference on Huanglongbing. Orlando, Florida, USA. (http://www.doacs.state.fl.us/pi/hlb_conference/events.html)
25. Su, H. J. and Chu, J. Y. 1984. Modified technique of citrus shoot-tip grafting and rapid propagation method to obtain citrus budwoods free of citrus viruses and Likubin organism. Pr.c. Int. Soc. Citriculture 2:332-334.
26. Su, H. J. and Chang, S. C. 1976. The response of the Likubin pathogen to antibiotics and heat therapy. PP. 27-34. In E. C. Calavan, (ed). Proc. 7th Conference of IOCV, University of California, Riverside.
27. Su, H. J. and Matsumoto, T. 1972. Further study on the pathogen complex causing Likubin of citrus in Taiwan. PP. 28-34. In W. C. Price (ed). Proc, 5th Conference of IOCV University of Florida Press, Gainesville.
28. Tomimura, K. *et al*., 2009. Evaluation of genetic diversity among “*Candidatus* Liberibacter asiaticus” isolates collected in Southeast Asia. Phytopathology 99: 1062-1069.
29. Tsai, C. H., Hung, T. H. and Su, H. J. 2008. Strain identification and distribution of citrus Huanglongbing bacteria in Taiwan. Botanical Studies 49: 49-56.

ABSTRACT

The Development and Effective Use of Pathogen-free Seedling as the Main Component of IPM of Citrus Huanglongbing Disease

H. J. Su[1,3], C. H. Tsai[2], Y. C. Feng[1] and T. H. Hung[1]

[1] Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University, Taipei 106, Taiwan

[2] Dept. of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute, Wu-feng, Taichung 413, Taiwan

[3] Corresponding author, Email: hjsu@ntu.edu.tw

Citrus Huanglongbing (HLB) locally called “Likubin” was fist identified in Taiwan in 1951, and became seriously epidemic over the island in 1956. Thenafter, Matsumoto and his colleagues started etiological study on the disease and clarified the transmissible nature as a virus-like disease and finally found phloem-limited fastidious bacteria with pleomorphic morphology to be associated with HLB. Nowadays, the tropical form of psyllid-borne HLB pathogen has been nominated as *Candidatus* Liberibacter asiaticus. So far, the authors identified four strains of HLB pathogen in Taiwan. The greening disease commonly with mix-infection of citrus tristeza and/or tatter leaf viruses, causes sever yellow mottling and decline, and ultimately death of citrus tree. These systemic diseases are generally controlled by the integrated control measures including cultivation of pathogen-free seedlings, elimination of inoculum sources and prevention of secondary spread by controlling vector insects. Establishment of pathogen-free nursery system is primarily important for preventing prevalence of these diseases. The pathogen-free nursery system has been properly performed through improved techniques of shoot-tip micrografting for obtaining virus/HLB-free citrus foundation stocks, and then production of healthy citrus seedlings within insect-proof screen house under health certificate regulation in Taiwan. The precise and rapid indexing techniques are indispensable for management of pathogen-free nursery system

and health management of citrus tree in the field. Production and cultivation of pathogen-free and high-quality nursery trees are fundamentally important component of HLB management. A healthy citrus orchard planted with pathogen-free seedling may outlive the grower. Healthy citrus trees have a great potential for sustainable high yield over many decades, provided appropriate horticultural and disease management practices are followed.

Key words: Citrus Huanglongbing、HLB strain、health management、pathogen-free nursery system

近年來國內植物寄生性線蟲之發生與防治

蔡東纂
國立中興大學植物病理系
聯絡作者，電子郵件信箱：Tttsay@nchu.edu.tw

摘　　要

統計自 1913 年澤田兼吉先生針對台灣植物寄生性線蟲首報至今 86 年間，以目前的分類系統，台灣共有 28 屬 62 種被披露。其中小麥腫瘿線蟲（*Anguina* spp.）及莖線蟲（*Ditylenchus* spp.）描述不明。大豆包囊線蟲（*Heterodora glycines*）經二十多年的調查未曾發現，疑為報告有誤，但已列國際文獻中。台灣作物線蟲病害主要為根瘤線蟲，已知有 *Meloidogyne arenaria, M. graminicola, M. hapla, M. incognita, M. incognita acrita* 及 *M. javanica*，前三種為近 20 年來引入者。松材線蟲（*Bursaphelenchus xylophilus*）自 1985 年於台北縣發現迄今，又鑑定出 *B. mucronatus* 及 *B. thailandae* 兩種，罹病樹種更擴及原本判定為抗病品種之台灣二葉松及馬尾松。葉芽線蟲（*Aphelenchoides besseyi*）也由危害水稻、草莓，進而至山蘇及秋石斛兩者葉片；爾來水草、蘭科植物及松樹也有不明種類寄生。植物寄生性線蟲之防治於專業區，如大湖草莓實施玉米、水稻或芋頭輪作，皆有助於降低草莓根系主要病原線蟲 *Meloidogyne incognita, M. hapla, Pratylenchus coffeae* 及 *P. penetrans*。以鏈黴菌 *Streptomyces saraceticus* 之生物製劑 LTM 防治番石榴根瘤線蟲，和農藥 DCIP 之效果相近。

關鍵詞：植物寄生性線蟲、根瘤線蟲、松材線蟲

台灣記錄之植物寄生性線蟲種類

台灣植物寄生性線蟲攸關報導始於1913年澤田氏對寄生於柑桔根部線蟲之描述[10]，隨後於1924年列舉41科115種根瘤線蟲寄主[11]。1970到1971年間，黃氏等人[5]全面調查本省雜糧、特用作物、蔬菜、果樹、花卉、樹木及其他共140種植物，統計有27屬之植物寄生性線蟲存在於農地中。本省作物線蟲病害調查報告多集中於60年代，蔡氏[9]以作物別整理出19屬47種線蟲，然以目前的分類系統，台灣共有28屬62種線蟲(表一)。

表一、台灣植物寄生性線蟲種類統計

年代	屬	種	作者
1971	27		黃炤雄等
1971	19	47	蔡雲鵬
1982	15	29	林奕耀
1997	30	38	蔡東纂
2010	28	62	蔡東纂

其中 *Radopholus* spp.為洪氏[3]得自香蕉根系，有三種之多，然非 *R. similis*。洪氏[25]尚於 1958 年報導屏東地區大豆田有大豆包囊線蟲(*Heterodera glycines*)存在，筆者數度前往調查，仍未有所獲。台灣作物線蟲病害主要為根瘤線蟲，已知有 *Meloidogyne arenaria, M. graminicola*(圖五、六), *M. hapla, M. incognita, M. incognita acrita* 及 *M. javanica*，前三種為近20年來引入者。其中，過去未曾發現之北方根瘤線蟲(*Meloidogyne hapla*)出現在苗栗大湖草莓園，王氏[1]推測其引入可能於1975至1976年間隨草莓苗自美國或日本攜進。上述台灣歷年來植物寄生性線蟲收編於表二。台灣松樹萎凋病(pine wilt disease)於1985年首先在臺北縣石門、金山一帶發現，到1988的三年間，病害在台灣北部地區迅速蔓延，陸續在三峽、桃園等15個地區發現[14, 48]，且近期報導指出在金門[13]、惠蓀林場、德基水庫[47, 51]、東勢及雪霸國家公園發現萎凋病[50]，且罹病松樹上可分離出松材線蟲 *Bursaphelenchus*

xylophilus。此外，報告中亦指出，自苗栗南庄地區感染松樹萎凋病之琉球松分離出 *B. thailandae*，自新竹峨眉、勝興車站與武陵農場等地之台灣二葉松亦分離出 *B. mucronatus* [16]。爾來水草、天南星科、蘭科植物及松樹也有不明種類寄生(圖一~四、圖七、圖八)。

表二、台灣之植物寄生性線蟲

Nematode	Common name	Major hosts
Anguina spp.	Seed and leaf gall N.	Unknown
Aphelenchoides besseyi	Foliar or leaf N.	Rice, strawberry
A. spp.		Orchid
A. composticola		Mushroom
A. fragariae		Aquatic plants
Aphelenchus avenae		Mushroom
Bursaphelenchus xylophilus	Pine wood N.	Pine
B. mucronatus		Pine
B. thailandae		Pine
Criconemoides citri	Ring N.	Citrus
C. rusticum		Sugarcane
Ditylenchus myceliophagus		Mushroom
Ditylenchus spp.		Loquat, Longan
Dorylaimus spp.		many crops
Gracilacus spp.		Pear, Bamboo
G. aculenta		
G. bilimemta		
Helicotylenchus brevicaudatus		
H. crenacauda	Spiral N.	Rice
H. dihystera		Tea
H. erythrinae		Tea
Hemicriconemoides californianus		
H. kanayaensis	Shearh N.	Tea
H. parasinensis		
Hemicycliophora spp.	Sheath N.	Sugarcane
Heterodera glycines	Cyst N.	Soybean
Hirschmanniella oryzae	Rice root N.	Rice
H. mucronata		

表二、台灣之植物寄生性線蟲(續)

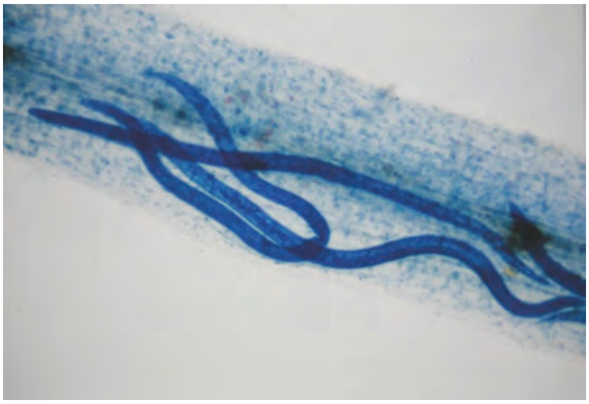
Nematode	Common name	Major hosts
Hoplolaimus spp.	Lance N.	many crops
H. columbus.		
Longidorella spp.		Longan
Longidorus spp.	Needle N.	many crops
Meloidogyne arenaria	Peanut root-knot N.	Peanut
M. graminicola		Rice, Garlic
M. hapla	Northern root-knot N.	Strawberry
M. incognita	Southern root-knot N.	many crops
M. incognita acrita		Tomato
M. javanica	Javanese root knot N.	many crops
Paraphelenchus myceliophthorus		Mushroom
Para. lepidus		
Para. minutus		
Paratylenchus spp.	Pin N.	Tea
Pratylenchus brachurus	Lesion or meadow N.	Banana
P. coffeae		Citrus
P. loosi		Tea
P. penetrans		Banana, Strawberry
P. pratensis		Citrus, Sugarcane
P. zeae		
Pratylenchoides spp.		Corn, Citrus, Bamboo
Rotylenchulus reniformis	Reniformis N.	Vegetables, Banana
R. brachyurus	Spiral N.	Peanut
R. buxophilus		Sugarcane
R. multicinctus		Citrus
R. robustus		Sugarcane
Scutellonema spp.	Spiral N.	Gladiolus
S. brachyurum		
Trichodorus christiei	Stubby root N.	Sugarcane
T. truncatum		
Trophurus spp.		Sweet potato, Corn
Tylenchorhynchus annulatus		
T. cylindricus		
T. leviterminalis		

表二、台灣之植物寄生性線蟲(續)

Nematode	Common name	Major hosts
T. martini	Stunt or Stylet N.	Rice, Seedlings
T. nudus		Sugarcane
T. zeae		
Tylenchulus semipenetrans	Citrus N.	Citrus, Grape
Tylenchulus spp.		many crops
Xiphinema americanum	Dagger N.	
X. brevicollum		
X. diffusum		
X. elongatum		
X. hunaniense		
X. lncognitum		
X. lnsigne		
X. oxycaudatum		
X. radicola		

圖一、植物寄生性線蟲於天南星科寄主根系產生之紅褐色病徵。

圖二、植物寄生性線蟲線蟲於天南星科寄主根系產生之紅褐色病徵。



圖三、天南星科之罹病根系經染色後可見植物寄生性線蟲。

圖四、根瘤線蟲於天南星科植物造成根系之腫大。

圖五、根瘤線蟲造成水稻幼苗發育不良。

圖六、水稻根系感染根瘤線蟲後結瘤纍纍。

圖七、葉芽線蟲寄生於南極杉頂芽分生組織。

圖八、南極杉頂芽分生組織染色後可見葉芽線蟲纏聚成球狀。

台灣作物線蟲病害防治對策

就作物病蟲害的防治觀點而言，可分為除滅(kill)及管理(management)兩種方式[22]。「除滅」意味著以化學藥劑於短期內達到降低病蟲族群密度至顯著程度。相反的，「管理」之作為係以特定之策略於一段時期後降低病蟲族群密度至為害作物水平之下。病原線蟲之引進，除了灌溉水、土壤(培土)及農機具等引進方式外，最主要的因素是種苗攜帶；而在土壤條件適宜、寄主感受性高之情形下得以發展其族群，在耕地中維持足以為害作物之程度。因此，在克服線蟲病害之因果對策上，須在斷絕外因(栽培健康種苗)、

種剋果之因(選植抗線蟲作物品種或砧木)及消除惡果(以除滅或管理方式降低土壤中線蟲密度)等方面著手，茲分述如下：

一、栽培健康種苗

農友習慣於耕地上自行育苗，近年來花卉及蔬菜種苗雖多購自種苗商；然植前之馴化期則照常在耕地上進行，以致在給水後穴盤底部之苗株根系感染來自耕地中之病原線蟲。解決之道即以塑膠布舖地，隔絕線蟲感染源，或採高架馴化方法。果樹苗木來源不定，農友亦多以零星原地補植方法淘汰罹線蟲病衰弱株，除非施用殺線蟲藥劑加以保護，否則新株遭線蟲感染是必然的。球根作物或以側芽繁殖之作物，如球根花卉、山葵、薑、馬鈴薯及山藥等，植前病原線蟲檢疫是降低病害風險之重要事項[8]。球根植前浸泡殺線蟲劑之處理以罹南方根瘤線蟲之大岩桐種球為例，浸泡歐殺滅、滅線蟲及芬滅松一小時後，可降低線蟲感染率 73.6％、61.1％及 68.6％[7]，仍未臻完善。

二、選植抗線蟲作物品種或砧木

栽植抗線蟲作物品種(nematode resistant cultivars)是降低線蟲密度，減少施藥成本，縮短輪作期間及避免殺線蟲劑殘毒之慮的最佳方法[18]。問題是，抗性品種之產物常不合市場需求；或者其抗性對象侷限於屬內少數種線蟲，而無法在田間應用[43]。對寄主廣泛的根瘤線蟲而言，抗性品種亦不多，如蔬菜專業區常見的豆、瓜及茄子之抗性品種分別為 11、5 及 4 種，且其抗性範圍僅二、三種根瘤線蟲而已[21]。但如與經濟品種親和性良好者，可考慮作為砧木材料；茄科作物 *Solanum torvum* 即成功的作為茄子砧木對抗 *M. incognita*、*M. javanica* 及 *M. arenaria*[20]。多年生果樹之線蟲病連作障害以嫁接抗性砧木之新株全面更新或補植即可克服。如本省罹柑桔線蟲(*Tylenchulus semipenetrans*)及根腐線蟲(*Pratylenchus coffeae*)引致衰弱病之柑桔園，可用枳殼(*Poncirus trifoliata*)及其雜交種取代感病性高但普遍被使用之酸桔及廣東檸檬為新株砧木以避免線蟲危害[4]。本省種植之巨峰、黑

后、金香、義大利及奈加拉等葡萄品系皆為南方根瘤線蟲之感受性品系；經篩選全世界常用的 42 個葡萄品系後，其中 Harmony、SO4、5BB Selection Kober、Muscat Bailey A 及 5C Teleki 等為高抗性等級，可作為改善長期罹線蟲病葡萄園之砧木材料[(6)]。

三、以除滅或管理方式降低土壤中線蟲密度

在許多農作栽培業者心中，「線蟲防治」意味著施用劇毒殺線蟲劑，因而有講究施用方法、時機及安全設備之必要，以保護自身安全及避免農產品農藥殘留。除了使用燻蒸劑、觸殺性及系統性殺線蟲劑外，尚有非農藥線蟲病害管理方法，如植前種苗之物理方法及嚴格檢疫(quarantine)、淹水(flooding)、加熱(heat)、覆土(subsoiling)、使用抗病砧木(rootstock)、農地休閒(fallowing)、實施栽作系統(cropping system)、田間衛生(field sanitory)、阻絕傳播途徑(isolation)、生物防治(biological control)及有機質添加物(organic amendments application)等。上述方法中頗有共通處或異曲同工之妙，如生物防治和有機質添加物之使用即是。此外，綠肥的栽植、土壤混拌及淹水，配合輪作，更是傳統性優良的土地保護性耕作法(conservation tillage)，對短期作物專業區線蟲病管理助益匪淺。

茲以化學防治(chemical control)及非農藥管理(nonchemical management)兩種克服作物線蟲病害方法分述如下：

一、化學防治

台灣農友在作物病蟲害防治上，對化學藥劑存有很強的依賴性，處理線蟲病害自不例外。目前，本省除了禁止使用的 ethylene dibromide(EDB)、1,2-dibromo-3-chloropropane(DBCP)及 aldicarb 之外，尚有 7 種燻蒸劑、12 種非燻蒸劑和 1 種有機物質作為農用線蟲病害防治資材。劑型則有粒劑、乳劑、粉劑、懸浮劑、可濕性粉劑及液劑等。燻蒸劑中之 D-D、1,3-D、EDB 及 DBCP 為純殺線蟲劑(true nematicide)；methyl bromide(MBR)、

chloropicrin(CPI)及 methyl isothiocyanate(MIT)為廣用燻蒸劑(multipurpose fumigant)。非燻蒸劑主要分有機磷劑(organophosphate)、氨基甲酸鹽(carbamate)、醚類(ethyl)及有機質(organic material)等。作用功能為觸殺性(contact action)的僅有普伏松(ethoprop)及滅線蟲(nemamort)兩種，適合短期作和全年採收性作物使用；其餘化學藥劑為系統性(systemic action)。而以有機質登記之蝦蟹殼粉(chitin-protein)，為美國 IGIN 公司出品之 Clandosan 618，具生物防治功能。由於燻蒸劑花費高(dazomet 及 MBR 每甲地八萬元新台幣藥劑費)，且須支付塑膠布及覆蓋費用，使用率甚低。農友較偏愛植後施用之系統性殺線蟲劑；一者施用方便，二者兼具殺蟲、殺蟎作用，唯如施藥時機不當則有殘毒之慮。其實，植物保護手冊推薦之殺線蟲劑施用方式，一年生作物如西瓜、番茄、薑、菸草、鳳梨等於植前穴施或條施；多年生果樹如柑桔及葡萄則於萌芽期環施或條施處理，為兼顧實際安全考量之作法。

二、非化學防治

1. 輪作(crop rotation)

輪作方式長久以來一直是農業上防治線蟲病良好的經營模式[36]。其主要作用不外抑制線蟲族群密度至不為害程度或防止該族群之增加。於針對特定線蟲種類之輪作系統中，感受性作物(susceptible crop)須和弱寄主作物(poor host crop)、非寄主或抗性作物(nonhost or resistant crop)交互種植，使該線蟲於一段時期中無法寄生繁殖，甚至飢餓死亡。如與花生、棉花及大豆輪作，以降低 *Pratylenchus brachyurus* 和 *P. zeae* 族群密度與其對玉米之為害[25]。儘管大豆包囊線蟲(*Heterodera glycines*) 有 16 個生理小種[39]，以抗病品種 Bedford 和玉米來和其他感病品種輪作有助於降低土壤中雌蟲數目[31]。再就熱帶棉花輪作系統而言，土壤中 *Meloidogyne incognita* 數目以和高粱輪作較與大豆輪作田為低，其效果於第三次種植棉花時更為明顯[34]。引用一些熱帶作物如弗州黎豆(velvet bean)、蓖麻(castor)、美國節苕(american jointvetch)及芝麻(seasame)用來輪作以防治根

瘤線蟲病害在美國東南部農地得到良好成果[40]；Mc Sorley 等人[33]更加以應用在北佛羅里達州之蔬菜生產上，有效控制根瘤線蟲(*M. incognita* race 1, *M. arenaria* race 1)族群密度在最低水平，使茄子等作物產量增加。Be`lair[12] 針對北方根瘤線蟲(*M. hapla*)之輪作防治系統之建立，提供完整之模式及程序：他先將 *M. hapla* 的弱寄主或非寄主(菠菜、蘿蔔、大麥、燕麥和小麥)及感受性寄主(高麗菜、芹菜、萵苣、青蒜、孔雀草和馬鈴薯)區分；再就當地主要作物之紅蘿蔔及洋蔥種植時期去搭配種植。將小區試驗結果最好之輪作系統於大規模田間印證，顯示以紅蘿蔔－洋蔥－燕麥－紅蘿蔔之栽種系統可降低 *M. hapla* 之田間族群密度，並增加紅蘿蔔產量 282％。如以傳統的洋蔥－紅蘿蔔輪作系統，則產量損失 50％。

2. 有機質添加(organic amendments application)

早於 1937 年，Linford 氏即發現土壤有機添加物(soil organic amendments)，在分解期間有顯著降低土壤中根瘤線蟲密度之效果[32]。土壤有機添加物之施用，有助於土壤中氮、磷、鉀三要素含量的提昇、土壤中金屬離子交換、鐵、銅、鎂及鋅嵌合態形成、土壤顆粒的結合、土壤透氣性及保水、排水力改良。由於栽作土壤環境較理想，較健康植株相對的比弱勢植株對線蟲的危害更有耐病性(tolerance)[46]。Sayre 認為[44]，施用有機添加物之所以能防治植物寄生性線蟲，其機制不外下列五點：(1)有機添加物之分解物對線蟲有直接毒性；(2)可增加線蟲天敵的種類和數量；(3)改變植物和線蟲的關係；(4)有機添加物在分解過程中產生有燻殺作用的氣體；(5)有機添加物在分解時產生熱度，傷害線蟲。

有機添加物中有些具有線蟲毒化物，並於土壤中釋放出殺線蟲物質(nematicidal principle)，可直接降低線蟲密度。Neem 種子所含 limonoids 已被定為天然殺線蟲劑 azadirachtin。經測試 limonoids 可致根瘤線蟲(*Meloidogyne incognita*)二齡幼蟲死亡，並抑制其卵之孵化[19]。且已明瞭其殺線蟲物質存在於脫脂部分。眾所皆知，孔雀草(marigold)含有毒質 polythienyls，可殺死線蟲[49]。*Hannoa undulate* 及 *H. klaineana* 兩種非洲香料植物中所含三種 polycyclic lactones (chaparrione，klaineanone 及

glaucarubolone)亦有毒殺線蟲作用。我國農友常用作為有機添加物的蓖麻粕(castor pomace)中亦含有蓖麻毒素(ricin)，可降低南方根瘤線蟲行動能力[38]。

此外，在有機添加物於土壤中的分解物對線蟲有害，如 ammonia，nitrites，hydrogen sulphide，多種揮發物質及有機酸，能直接殺死線蟲或間接的妨礙線蟲卵孵化及降低線蟲二齡幼蟲之移動性[35]。其中 ammonia 濃度如於每公斤土壤中超過 30 毫克，將有效防治線蟲[41]。因此，如於土壤中加入尿素 30mg/Kg，經 urease 轉化為 ammonia，也可變成經濟有效的殺線蟲劑。筆者用此方法，以塑膠布覆蓋，對連作田中之根瘤線蟲和外寄生性線蟲之除滅甚有效果[7];如再以苦土石灰及長效性有機質拌入土中，則對植物發育收效更佳。

作物線蟲病害之管理，除了殺蟲劑之施用外，伴隨使用有機添加物及綠肥，在防治番茄根瘤線蟲病害頗具成效。而以色列的 Spiegel[45]等人更成功的以蝦蟹殼作為有機添加質材防治番茄根瘤線蟲(*Meloidogyne incognita*)、甘藍包囊線蟲(*Heterodera schachtii*)、小麥包囊線蟲(*Heterodera avenae*)及柑桔線蟲(*Tylenchulus semipenetrans*)；其機制乃幾丁質分解性放射線菌(Chitinolytic *Actiomycetes*)數目大增，降低線蟲卵之孵化，從而減輕線蟲之危害。爾來，Westerdahl 等[42]以幾丁質加入尿素作為土壤有機添加材料，有效防治胡桃根腐線蟲(*Pratlenchus vulnus*)及馬鈴薯根瘤線蟲(*M. chitwoodi*)等。

3. 生物防治(biological control)

有許多生物學者熱衷於生物防治植物病蟲害，對研究特定病蟲害天敵之生態及繁殖不餘遺力，但是在田間應用時常忽略了提供天敵良好生存環境，效果大打折扣。有機添加物之混合物即在供給天敵微生物養料，作為生物防治之基礎條件。線蟲天敵於自然界中廣泛存在，如 Virus、Bacteria、Rickettsia、Furbellarians、Nematodes、Enchytraeids、Mites、Collembola、Insects 等。在全世界五百多篇線蟲生物防治報告中，以真菌為材料者佔 76%、其次為獵食性線蟲 7%，細菌和放射線菌佔 5%左右，

餘者在3%以下；上述生物對線蟲取食或寄生的對象不外卵、幼蟲、雌雄成蟲及胞囊[30]。其在線蟲生物防治上之應用型態又分為人海戰術(inundation)、引進(introduction)及天然(nature)防治三者。「人海戰術」及「引進」兩種方式皆須大量生物材料，並得時常添加，且須顧及所使用生物材料之生存能力，因此以使用溫室或移植作物時，作為保護性質為目的者居多。「天然」防治所施用材料多為本土固有種類，較易建立其族群及發揮能力，若能配合適當添加物之使用，當可有利於多年生及連作性作物線蟲病害之克服。作物線蟲病生物防治劑較成功而被商品化的如卵寄生菌 *Paceilomyces lilacinus*，以椰子碎片作為商品配方基質曾在 60 多個國家試驗過，然效果好壞不一[27]。以 *Arthrobotrys irregularis* 製成的 Royal 350 線蟲防治劑，對根瘤線蟲有田間防治效果[26]；Royal 300 則使用於洋菇栽培上防治 *Ditylenchus myceliophagus*[40]。

4. 太陽能土壤消毒(solarization)

就防治策略之土壤植前處理方式而言，淹水或休耕等長時間之作法較不適當；輪作方式則因經濟效益考量，輪作作物選擇不易；殺線蟲劑或燻蒸劑之施用雖收益良好，但有違環保原則之慮。自從 1869 年 CS2 應用於土壤燻蒸以來，chloropicrin (PIC)、methyl bromide (MBR)、1,3-dichloropropene (1,3-D)、ethylene dibromide (EDB)、1,2-dibromo-3-chloropropane (DBCP)及 methyl isothiocyanate(MIT)相繼被廣泛使用於農地之殺蟲滅菌用途。幾年來、DBCP 基於環保理念下被禁，EDB 亦恐有致癌後遺症而停止使用；而使用量最多的 MBR 也將因影響空氣品質將於公元 2000 年全世界禁產禁用[52]。事實上，在劇毒性殺線蟲劑及燻蒸劑逐一被檢討限制使用之際，開發土壤處理技術是刻不容緩之事。Huebner 等人[24]曾報導尿素衍生物而來的氨氣有殺蟲的效用，如配合添加造紙纖維廢料，不但可降低殘留之植物致毒性，並可激發土壤微生物族群及酵素活性。結果顯示，尿素混拌於含水量 30 至 35%土壤中後，在以 0.25mm 透明塑膠布覆蓋，遠比不覆蓋處理者效果為佳。透明塑膠布覆蓋方式(solarization)自 1930 年於夏威夷防治鳳梨 *Heterodera radicola*

(Greef) Muller 以來[23]，已廣泛應用於土壤加熱消毒用途。幾乎所有植物寄生性線蟲可於 44 至 48℃溫度下被殺死[17]，而即使在美國佛羅里達西北部(30.0N.,84.4W)，1992 年之 6 至 7 月間，透明塑膠布覆蓋下 5,15 及 25 公分深之土壤，亦分別達到 49.5、46 及 40.5℃之溫度；對番茄青枯病(bacterial wilt)及 *Meloidogyne* spp. *Paratrichodorus minor*、*Helicotylenchus* spp.、*Rotylenchulus reniformis* 及 *Criconemella* spp.等線蟲具有良好防治效果[15]。於 1993 年 7 至 9 月之田間試驗於同樣土壤深度下，分別測得最高地溫為 60.5℃、52 及 43.5℃。多年來，全世界有關此種太陽能消毒土壤之試驗結果指出，成功的關鍵主要是充裕之日照及高溫地域條件[29]；地處亞熱帶之台灣自當多加利用。筆者等研究結果顯示，以尿素作為土壤植前處理在盆缽試驗效果甚佳，可降低根瘤指數 32.5 及 50％；如以透明塑膠布覆蓋、在 1.0％及 0.1％施用下，分別於第 3 及 6 星期時，即無法檢出根瘤線蟲；即使在不覆蓋情形下，其殺線蟲效果亦比僅覆蓋塑膠布之太陽能處理方式為高。田間試驗結果亦證明施用尿素並覆蓋塑膠布後一星期，土壤中根瘤線蟲密度即明顯下降，於第五星期時已接近於零，和殺線蟲劑 phenamiphos 之處理效果相去不遠[7]。覆蓋透明塑膠布之所以有提高土壤溫度之作用，源自溫室效應(greenhouse effect) [29]；於土壤中拌加尿素，使產生之氨氣有更長時間充留於土壤空隙中，加強除滅線蟲之作用。杜氏等[2]以覆蓋透明塑膠布方式防治番茄白絹病，發現若於土壤中添加苜蓿、太陽麻或玉米莖等有機綠肥者，較未添加者為優；其作用可能和植物莖葉在土中分解時產生氨氣及 butyric acid 對真菌、細菌或線蟲之致毒性攸關[37]。以太陽能配合尿素施用一個月即可大幅降低土壤中植物病原線蟲密度；較其他土壤燻蒸劑使用費用低廉，甚至可取代燻蒸性農藥克服植物病原線蟲病害。

引用文獻

1. 王國強、楊瓊儒、蔡安娜。1977。臺灣 *Meloidogyne hapla* 根瘤線蟲之初次發現。 植保會刊 19(4):311.
2. 杜金池、程永雄、黃杉芪。1991。應用太陽能及有機綠肥對番茄白絹病之防治效果。植保會刊 33:95-102.
3. 洪元平、洪文禮、陳珠惜。1966。台灣香蕉寄生性線蟲種類及其分佈。植保會刊 8:53-58.
4. 張喜寧。1980。抗根腐線蟲及柑桔線蟲柑桔根砧之選拔與測試。中國園藝 26:71-77.
5. 黃炤雄、蔡雲鵬、林奕耀、杜金池、黃修斌。1972。臺灣植物寄生性線蟲。中研院植研所專刊第一號。
6. 蔡東纂、林奕耀。1992。葡萄品系與砧木對南方根瘤線蟲之感受性。植保會刊 34:301-306.
7. 蔡東纂、程永雄、陳弘毅、林奕耀、吳文希。1995。球根花卉線蟲病害之發生及防治。植病會刊 4: 180-192.
8. 蔡東纂。1995。植物病原線蟲檢疫。植病會刊 4:43-59.
9. 蔡雲鵬。1971。台灣之植物寄生性線蟲。臺灣農業 7(3):139-151.
10. 澤田兼吉。1913。柑桔立枯病(預報)。臺灣農事報 7(10):903-914.
11. 澤田兼吉。1924 台灣に於ける根線蟲の寄主植物。臺灣博學學會會報 14 (72):16-24.
12. Be`lair G. 1992. Effects of cropping sequences on population densities of *Meloidogyne hapla* and carrot yield in organic soil. J. Nematol.24:450-456.
13. Chang, R. J., Cheng, T. C., Feng, Y. S., Hsu, K., and Ho, Y. M. 1994. The occurrence of pine wilt disease in Kimen. Taiwan For. Sci. 20 (11): 12-13. (in Chinese)
14. Chang, R. J. and Lu, S. S. 1996. Investigation of the occurrence of pine wilt disease and its naturally infected hosts in the Fushan Botanical Garden. Taiwan J. For. Sci. 11 (2): 201-207. (in Chinese)

15.Chellemi, D. O., Olson, S. M., Scott,J.W., Mitchell, D. J., and McSorley, R. 1993. Reduction of phytoparasitic nematodes on tomato by soil solarization and genotype. Suppl. J. Nematol. 25:800-805.

16. Chen, P., Huang, Y. Y., Tsay, T. T. and Yen, J. H. 2006. Distribution of Pine wilt diseases in Taiwan and the study of its causal nematodes. Plant Pathol. Bull. 15:263-274. (in Chinese)

17. Christie, J. R. 1959. Plant Nematodes, their Bionomics and Control. Jacksonville, FL .The H & WB Drew Co. 362pp.

18. Cook, R., and Evans, K. 1987. Resistance and tolerance. In Principle and Practice of Nematode Control in Crops, eds. R. H. Brown, B., R. Kerry, pp.179-231. Sydney. Academic, 447pp.

19. Devakumar, C., Goswami, D. K., and Mukerjee, S. K. 1985. Nematicidal principles from neem(*Azadirachta indica* A. Juss). Part I. Screening of neem kernel fractions against *Meloidogyne incognita*. Indian Journal. of Nematology 15:121-124.

20. Dunay, M. C., and Dalmasso, A. 1985. Multiplication de *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne incognita*, et *M. arenaria* surdivers Solanum Revue de Ne`matologic 8:312-334.

21. Fassuliotis, G. 1979 .Plant breeding for root-knot nematode resistance. In: Root-knot nematodes(*Meloidogyne* species), eds. Lamberti, F., and Taylor, C. E. Systematics, Biology and Control. London, Academic Press, pp.425-453.

22. Gove, P. B. (ed.), 1981. Webster Third New International Dictionary .Merriam Webster, Inc., Springfield, MA.

23. Hagan, H. R. 1993. Hawaii pineapple field soil temperatures in relation to the nematode *Heterodera radicola*(Greef) Muller. Soil Sci. 36:83-95.

24. Huebner, R. A., Rodriguez-Kabana, R., and Patterson, R. M. 1983. Hemicellulosic waste and urea for contol of plant parasitic nematodes: Effect on soil enzyme activities. Nematropica 13:37-54.

25. Hung, Y. 1958. A preliminary repery on the plant-parasitic nematodes of soybean crop of Pingtung District. Taiwan, China, Agric. Pest news 5:1-5.
26. Jatala, P. 1985. Biolgical control of nematodes, in: An Advanced Treatise on *Meloidogyne* Vol. I: Bioligy and Control(J. N. Sasser and C. C. Carter, eds), pp. 303-308. Dept. plant pathology, North Carolina state Univ. Raleigh.
27. Jatala, P. 1986. Biological control of plant parasitic nematodes. Ann. Rev. Phytopath. 24:453-489.
28. Johnson, A. W., Dowler, C. C., and Hauser, E. W. 1975 Crop rotation and herbicide effects on population densities of plant parasitic nematodes. J. Nematol. 7:158-168.
29. Katan, J. 1981. Solar heatingg(solarization) of soil for control of soilborne pests. Ann. Rev. Phytopathol. 19:211-236.
30. Kerry, B. R. 1987. Biological control. in: Principles and Practice of Nematode Control in Crops. Brown, R. H and Kerry, B.R. eds., pp. 233-263. Academic Press. London.
31. Lawrence, D. Y. 1994. Changes in the *Heteroderm glycines*. Female Index as Affected by Ten-year Cropping Sequences J. Nematol.26:505-510.
32. Linford, M. B. 1937. Stimulated activity of natural enemies of nematodes. Science 85:123-124.
33. Mc Sorley, R., D. W. Dickson, J. A. de Brito, and R. C. Hochmuth. 1994. Tropical Rotation Crops Influence Nematode Densities and Vegetable Yields. J. Nematol. 26:308-314.
34. Mc Sorley, R., and R. N. Gallaher. 1993. Effect of Crop Rotation and Tillage on Nematode Densities in Tropical Corn. Supl. J. Nematol.25:814-819.
35. Mian, I. H., and Rodriguez-Kabana, R. 1982b. Survey of the nematicidal properties of some organic materials available in Alabama as amendments to soil for control of *Meloidogne arenaria*. Nematropica 12:235-246.

36. Nusbaum, C. J., and H. Ferris. 1973. The role of cropping systems in nematode population management. Ann. Rew. Phytopathol. 11:423-440.
37. Patrick, Z. A., Syre, R. M., and Thorpe, H. J. 1965. Nematocidal substances selective for plant parasitic nematodes in extracts of decomposing rye. Phytopathology 55:702-704.
38. Rich, J. R., Rahi, G. S., Opperman, C. H., and Davis, E. L. 1989. Influence of the castor bean (*Ricinus communis*) letin (Ricin) on motility of *Meloidogyne incognita*. Nematropica 19:99-103.
39. Riggs, R. D., and D. P. Schmitt. 1988. Complete characterization of the race scheme for *Heteroderm glycines*. J. Nematol. 20:392-395.
40. Rodriguez-Kabana. R., D. G. Robertson. L. Wells., P. S. King., and C., F., Weaver. 1989. Crops uncommon to Alabama for the management of *Meloidogyne arenaria* in peanut. Supl. J. Nematol. 21:712-716.
41. Rodriguez-Kabana, R. & King, P. 1980 Use of mixtures of urea and blackstrap molasses for control of root-knot nematodes in soil. Nematropica 10:38-44.
42. Sasser, J. N., and Freckman, D. W. 1987. A world perspective on Nematology:The role of the Society. pp.7-14. In Vistas on Nematology. Veech, J. A. and D. W.Dickson,(eds.) Society of Nematologists INC., Hyattsville, Maryland, U.S.A.
43. Sasser, J. N., and Kirby, M. F. 1979. Crop cultivars resistant to root-knot nematodes *Meloidogyne* species. A cooperative publication of the Department of Plant Pathology, North Carolina State University and the United States
44. Sayre, R. M. 1971. Biologic influence in soil enviroment. In: B. M. Zuckerman et al., (eds.), Plant Parasitic Nematodes. I. Morphology, Anatomy, Taxonomy and Ecology. Acad. Press, New York and London, pp.235-256.

45. Spiegel, Y., Cohn, E., and Chet, I. 1989. Use of chitin for controlling *Heterodera avenae* and *Tylenchulus semipenetrans*. J. Nematol. 21:419-422.

46. Stirling, G. R. 1991. Biological Control of Plant Parasitic Nematodes. Progress, Problems and Prospects. C. A. B. Internation. 282pp.

47. Tzean, S. S. and Yen, J. H. 1989. The development and control of pine wilt nematode in Taiwan. In: Proceeding symposium on plant nematode disease control. Tu, C. C. and Cheng, Y.H. eds. Pp.15-32. Taiwan Agricultural Research Institute. (in Chinese)

48. Tzean, S. S., Yen, J. H. and Chang, R. J. 1997. Pine wood nematode page. 42 pp. Taiwan For. Res. Ins. (in Chinese)

49. Van Gungy, S. D., and J. W. Meagher. 1977. Citrus nematode(*Tylenchulus semipenetrans*)problems worldwide. Proc. Int. Soc. Citricult. 3:823-826.

50. Wu, M.-L., Chang, T.-T., Fu, C.-H., Feng, Y.-C., Wang, L.-C. 2004. PCR detection applied in astudy of the causal agent of pine wilt disease in Taiwanese red pine, *Pinus taiwanensis*. Taiwan J. For. Sci. 19: 89-96. (in Chinese)

51. Yen, J. H., Tzean, S.S. and Chang, R. J. 1997.Occurrence of pine wilt disease in Taiwan red pine, Pinus taiwanensis, in Taiwan. Plant Patho. Bull. 6: 49-57. (in Chinese)

52. Zuckerman, B. M., and Esnard, J. 1994. The Quest for Plant Nematode Biological Control: Facts and Hypotheses. Proceedings of International Symposium on Biological Control of Plant Disease. Korea, pp. 62-74.

梨葉緣焦枯病

蘇秋竹[1,3]、馮鈞育[1]、高清文[1]、曾國欽[2]、徐世典[2]

[1] 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

[2] 國立中興大學植物病理學系

[3] 聯絡作者，電子郵件信箱：auba@tactri.gov.tw

摘　　要

梨葉緣焦枯病(pear leaf scorch)為台灣特有之病害，普遍發生於橫山梨(*Pyrus pyrifolia*)栽植區，梨葉緣焦枯病菌之培養性狀及具波浪狀細胞壁(ripple cell wall) 的特性與侷限導管細菌(xylem-limited bacteria) *Xylella fastidiosa* 相同，但梨葉緣焦枯病菌與其他寄主植物來源之 *X. fastidiosa* 菌株間無血清相關性，且以 *X. fastidiosa* 廣效性引子對 272-1-int/272-2-int 及 RST31/RST33 對梨葉緣焦枯病菌菌株進行 polymerase chain reaction (PCR)反應時，亦無任何基因產物。利用隨機引子(OPA11)進行 random amplified polymorphic DNA (RAPD)分析，成功獲得對梨葉緣焦枯病菌獨有核酸片段大小為 1412 bp，從核酸序列中設計得到一組專一性引子對 PLS-F/PLS-R 可增幅出 416 bp 大小之專一性基因產物。此一引子對可直接進行梨葉緣焦枯病田間罹病梨樹組織之 PCR 檢測。利用 RAPD-PCR、enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR)及 BOX-PCR 三種 DNA 指紋圖譜技術分析所得之親緣樹狀圖皆可將 8 種寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株區分為 4 個菌群，分別為：(1)梨菌群、(2)夾竹桃及葡萄菌群、(3)桑椹菌群及(4)胡桃樹、李樹、桃樹及無花果菌群。此等指紋圖譜技術均可有效鑑別梨葉緣焦枯病菌，並顯示其為 *X. fastidiosa* 菌群中唯一之獨立菌系。進一步利用鄰聚法(Neighbor Joining)進行 10 種不同寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株系統親緣分析（phylogentic analysis），由 16S rRNA 序列及 16S-23S rRNA 區間序列所構建的親緣演化樹(phylogentic tree)皆可明顯區分為 2 個菌群，

分別為梨葉緣焦枯病菌菌群及其他 9 種寄主植物 *X. fastidiosa* 菌群，而其他寄主植物 *X. fastidiosa* 菌群皆可再細分 4 個次菌群，分別為(1)夾竹桃菌群、(2)葡萄及桑椹菌群、(3)咖啡及柑橘菌群及(4)胡桃樹、李樹、桃樹及無花果菌群。由以上結果顯示，梨葉緣焦枯病菌為 *Xylella* 屬內僅侷限於台灣獨立的菌群與其他寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株間為較低同源性，應可支持梨葉緣焦枯病菌為 *Xylella* 屬內亞種分類地位，甚至可能為新種。本文研發有關侷限導管細菌 PCR 鑑定與偵測技術，未來有潛力應用於梨葉緣焦枯病菌之蟲媒及中間寄主植物快速偵測。合理的管理栽培制度應可減輕梨葉緣焦枯病之嚴重度，剷除罹病株，可減少其感染源，無性繁殖時應避免剪取罹病株之枝條扦插或芽供接穗之用，化學治療方面，注射四環黴素於每年 5 月及 10 月各注射一次，有相當程度之療效，配合增施有機肥可維持病樹正常生產力。

關鍵詞： 梨葉緣焦枯病、侷限導管細菌、聚合酵素連鎖反應、偵測、DNA 指紋圖譜技術、16S rRNA 基因序列、16S-23S rRNA 基因區間序列、系統親緣分析

緒　言

梨為薔薇科(Rosaceae)梨亞科(Pomoideae)梨屬(*Pyrus*)植物，屬於落葉喬木，原產於亞洲、歐洲及非洲等地，種類極多，全世界栽培地區亦很廣泛，主要栽培種有西洋梨(*P. communis* L.; European pear)和沙梨(*P. pyrifolia* Nakai; Chinese sand pear or Japan sand pear)，目前許多商業化栽培品種(commercial cultivars)皆屬於此二種。台灣梨栽培種為沙梨，依栽培之模式可分為二類：一為高需冷性，如新世紀、幸水、豐水、新興、秋水、福壽、雪梨等品種，需種植於高海拔山區，才能正常萌芽、開花、結果；另為低需冷性品種主要是橫山梨，在低海拔地區即能正常開花結果[50]，最近 30 年來栽植橫山梨之果農流行以人為落葉方式進行產期調節，或以溫帶品種之梨穗寄接橫山梨徒長枝基部，生產高品質之『寄接梨』以提高橫山梨產業之經濟效益[49]。

梨葉緣焦枯病(Pear leaf scorch)為台灣低海拔地區(海拔 1200 公尺以下)栽植園之重要病害，為侷限導管細菌(xylem-limited bacteria) *Xylella fastidiosa* 所引起[48]，梨葉緣焦枯病是 1980 年左右在台灣橫山梨產區發生之新病害，田間罹病梨樹於每年 7 月前後才會呈現典型葉緣焦枯之病徵，提早落葉，逐年形成枝枯並呈現樹勢衰弱之現象，農友根據其病徵俗稱酥葉病，但病因不明，本病於 1990 年才被確認病因[47]，爾後在台灣各地橫山梨產區調查其發生率為 5-43％不等，而高海拔地區如梨山之溫帶梨品種無此病害發生之現象[48, 74]，目前僅知低海拔地區栽培之橫山梨、鳥梨及蜜雪梨品種皆會被感染，於各地栽植區普遍發生，不但造成梨樹葉緣焦枯病之病徵且降低梨樹的樹勢及活力，間接會影響梨樹或寄接梨果實之產量及品質。

X. fastidiosa 可為害許多重要經濟作物，例如葡萄(grapevine)、苜蓿(alfalfa)、桃樹(peach)、李樹(plum)、杏仁(almond)、榆樹(elm)、無花果(sycamore)、桑椹(mulbery)、柑桔(citrus)及咖啡樹(coffee)等[11, 21, 25, 26, 44, 53, 69, 77]，其中許多病害造成產業之嚴重損失，最典型例子如北美葡萄皮爾斯病(Pierce’s disease, PD)及南美柑橘斑駁黃化病(citrus variegated cholorsis, CVC)，目前為北美葡萄與巴西柑橘產業主要限制因子[40]。有關 *X. fastidiosa* 之歷史沿革，1892 年時 N. B. Pierce 首先於美國加州地區(California)發現葡萄(*Vitis vinifera* L.)之 PD 病害，由於此病在美國東南部發生相當嚴重，導致由歐洲引進之葡萄樹種大量死亡，造成農民重大損失[32]，爾後發現此病可經由嫁接及蟲媒而傳播，故認為此病應是由病毒(virus)所引起[29]，且經由研究蟲媒而發現位於葡萄園旁之苜蓿(alfalfa)具有高比例之苜蓿矮化病(alfalfa dwarf disease)，推斷此病可能與 PD 之發生有關[28]，而後經證實此二病害為同一病原菌所引起[25]。1971 年 Hopkins 和 Mortensen[39]發現發生 PD 之葡萄病株經四環黴素(tetracycline)處理後可抑制此病之發展，確定病因為原核生物引起。其後 Hopkins 和 Mollenhauer 藉由電子顯微鏡觀察病株導管組織時發現有病原菌之存在，由於其形態及細胞壁構造與 Rickettsiaceae 極為相似，故稱此病原菌為“Rickettsia-like bacteria (RLB)”由於此類病原菌存在於導管又稱侷限導管細菌[38]。然而此病原菌直到 1978 年 Davis 等人[18]利用 JD-1 培養基才可以人工培養，並完成柯霍氏法則，使得有關此菌之研究範

疇更為廣闊。1987 年 Wells 等人[78]根據 DNA 的 G+C 比、血清學(serology)資料、脂肪酸(fatty acid)分析及 16S rRNA gene 等分析結果，指出此病原菌並非 Rickettsiaceae，亦不屬於其它病原細菌，因而建議給予此類侷限導管細菌一新的名字 *Xylella fastidiosa*，以建立一新屬(genus)及此一新屬中唯一的一種(species)。

目前全世界 *X. fastidiosa* 所引起的病害，已被證實的寄主植物超過 145 種[35, 37, 40]，這些來自不同寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株，依交叉接種試驗資料似乎可再細分為病原型(pathotype)，例如來自於葡萄、苜蓿及杏仁之菌株稱為 PD 菌群，來自柑橘及咖啡之菌株稱為 CVC 菌群，來自桃樹及李樹之菌株為同一菌群[66]，而其他寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株目前仍缺乏交叉接種試驗之資料，主要受限於傳統之交叉接種試驗耗時費力，同時 *X. fastidiosa* 為國際檢疫病原菌其菌株不易取得，另一方面 *X. fastidiosa* 不易培養且生長速度緩慢，無法應用傳統之生理生化特性進行種內菌系的鑑別。

梨葉緣焦枯病病徵學

梨葉緣焦枯病罹病株田間病徵於每年 6-7 月(寄接梨果實採收期)開始出現葉緣焦枯，主要特徵是葉片邊緣及葉尖處出現褐化現象，褐化部分會轉為焦枯，有些鄰近健全葉片組織會有黃化現象，褐化之部位會逐漸向葉之中肋方向擴大癒合，焦枯之面積有些僅佔葉之小部分，較嚴重者可達葉面積一半，並會提早落葉，罹病枝條隨著季節發展葉緣焦枯之葉片會漸增加，徒長枝之葉片通常至 8-9 月才開始出現病徵，由下位葉逐漸往上出現葉緣焦枯之趨勢(圖一)；罹病的枝條逐年有明顯生長受阻，罹病株高接之果實較小，影響產量，嚴重者枝幹會逐年枯死，最後整株會逐漸死亡[48]。

X. fastidiosa 引起植物病害主要造成之病徵包括葉片邊緣焦枯、葉片離層產生、枝枯、延緩植物生長和植物活力衰弱導致死亡，其致病機制，一般學者皆認為病原細菌及植物之充塞細胞(tyloses)與膠質(gum)阻塞罹病植物之導管[8, 53, 54, 55, 58]，導致水份壓力(water stress)之產生，促使植物輸送水份之功能失調[3, 22, 23, 33, 53]，此論點亦衍生出植物毒素(phytotoxin)[45, 53, 68]和

生長調節劑失調(growth regulator inbalance)[23, 34]兩個假說(hypotheses)來解釋其致病機制，但確實之原因仍需更多之證據證實。

梨葉緣焦枯病根據電子顯微鏡觀察，病菌聚集在輸送水分之導管內，部份或全部阻塞(圖二)，導致罹病株寄主生理代謝失調，因而每年寄接梨採收期顯現葉緣焦枯之病徵？依據農委會張淑賢處長之分析結果，罹病株表現葉緣焦枯之葉片與正常葉片比較，顯示罹病株有明顯缺鉀現象，但鈣、鎂略有增加，其他營養成份並無差異，但施用鉀肥並無法減輕其病徵之表現，顯示罹病株病徵之表現是病原菌棲息寄主之導管才引起梨樹生理失調所致。

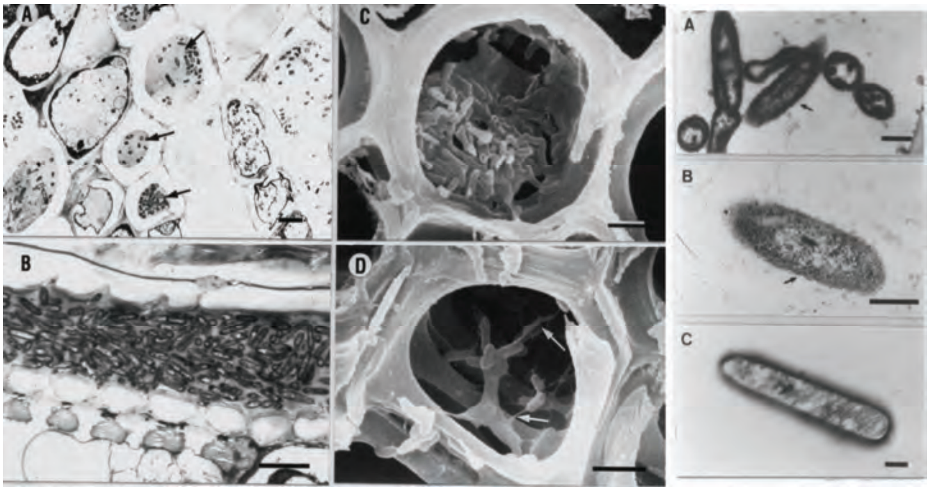
梨葉緣焦枯病原菌特性

梨葉緣焦枯病由侷限導管細菌 *X. fastidiosa* 所引起，細菌為革蘭氏陰性菌 (Gram-negative)、桿狀(rod-shaped)、具有波浪狀細胞壁(ripple-cell wall)，大小約 0.2~0.5×1.1×3.4 μm，病原菌在 PD3、PD2、BYCE、PW 和 CS20 五種培養基皆能生長，但在一般性培養基仍無法生長，在 PD2 固體培養基之菌落形成圓形突起，乳白色，具平滑邊緣，培養 14 天達 0.1~0.2 mm 大小[46, 48]，梨葉緣焦枯病罹病株條全年皆可自枝條莖部汁液分離到病原菌，其月平均分離率 4%~85%，顯示病菌整年皆可存活枝條內，由分離率之變化，枝條內病菌從每年 10 月至翌年 1 月為高峰期，而 3 月至 5 月為低峰期，罹病株葉柄亦可分離到病菌，但需葉緣焦枯病徵出現時才能成功分到病菌，顯示葉片內之侷限導管細菌，在葉片生長中期後才由枝條移動進入葉片內，但根部汁液無法成功分離到病菌[74]。

有關 *X. fastidiosa* 病原菌成功培養沿革，1978 年底 Davis 等人[18]首次利用 JD1 培養基成功分離到造成 PD 及 ALS 之病原菌後，為改進病原菌於培養基上之生長速度和狀況，1980 年 Davis 等人[20]將 JD1 培養基加以修正而發展出培養效果較佳之 PD2 培養基，隨後 1981 年 Davis 等人[19]又將 PD2 培養基加以修改，以 potato starch 取代 PD2 培養基中之 BSA 成份，並命名為 PD3 培養，及將 PD2 培養基中之 BSA 改為 charcoal，並命名為 PD4 培

圖一、梨葉緣焦枯病病徵(A)葉片不同程度葉緣焦枯病徵(B)罹病梨樹枝條呈現葉緣焦枯病徵。

Fig. 1. Symptoms of pear leaf scorch. (A) Different degrees of scorch symptoms on leaves. (B) Leaf scorch symptoms on the twings of diseased tree.



圖二、梨葉緣焦枯病侷限導管細菌棲息梨樹組織導管內之情形及其微細構造之照片。

Fig. 2. Micrographs of xylem-limited bacteria found in pear tissues with leaf scorch and its ultrastructure. Left- (A) Cross section shows bacterial aggregate in tracheids (arrows) of leaf lateral vein tissue; and (B) longitudinal section shows total occlusion of tracheid by bacterial aggregate. (C) Cross section shows partial occlusion by bacterial aggregate and (D) strandlike structure (arrows) a associated with xylem-limited bacteria.(Bar= 3 μm). Right-Ultrathin sections shows rod-shape and ripple-walled cells (arrow) in (A) diseased tissue and (B) axenic culture. (C) Cultured bacterium by negative stain. (Bar= 0.3 μm).

養基，此兩種培養基培養效果與 PD2 培養基效果一樣佳。此外由於 JD1 系列培養基無法培養 phony peach disease 及 plum leaf scald，故 Davis 等人又針對此兩種病之病原菌開發出 PW 培養基，而同年 Wells 等人[79]亦同時針對以上兩種病之病原菌開發出組成份不同於 PW 培養基之 BCYE 培養基。爾後 Chang 和 Walker[10]也開發出另一種類型之培養基，稱為 CS20 培養基，用於分離培養造成 oak leaf scorch 之病原菌，由於 *X. fastidiosa* 屬於難分離培養之細菌，加上對此菌之生長條件所知有限，因此以往所開發出之常用培養基中皆含有未確定組成份之物質，造成了對於此菌之營養需求、代謝過程及可能之生物合成機制皆無法探討，直至 1993 年 Chang 和 Donaldson[9]才成功開發出化學組成份確定之培養基(chemically defined medium)，稱之為 XF-26 培養基，使能對此菌之營養需求有更進一步之了解。雖然過去 *X. fastidiosa* 病原菌生長需特殊成份，但亦有報告[12, 24, 44]指出 mulberry leaf scorh 和 PD 病害之有些菌株能成功在 nutrient agar(NA)上生長，似乎此二種寄主菌株營養需求較 *X. fastidiosa* 其他不同寄主菌株較不嚴苛？

梨葉緣焦枯病菌經由嫁接途徑可成功傳播至健康梨樹[48]，同時田間觀察病株為點狀散列發生，病徵常從梨樹 1 或 2 支枝條出現，可能為典型蟲媒傳播病害型態分佈？目前筆者利用 PCR 技術在罹病梨園附近採集木質部取食者昆蟲(xylem feeders)白邊大葉蟬(*Kolla paulula* (Walker, 1858))成蟲曾偵測到正反應，基因產物進一步選殖解序証實為梨葉緣焦枯病菌系(未發表資料)，有關梨葉緣焦枯病菌蟲媒傳播資料仍待深入探討？國外有關 *X. fastidiosa* 之蟲媒最早報告為 1942 年 Hewitt[29]等人發現葉蟬(leafhopper)能傳播造成 PD 之病原菌，同年 Houston[42]等人亦發現葉蟬能傳播苜蓿矮化病。1946 年 Hewitt[31]等人發現葡萄園在接近苜蓿處受 PD 感染嚴重，並隨距離漸遠而漸少，因而認為兩者為同一病原菌所感染，並可經由蟲媒而互相傳播，目前已被證實的蟲媒計有 5 種，其分類地位分別屬於半翅目(Hemiptera)、葉蟬總科(Cicadelloidea)之大葉蟬亞科(Cicadellinae)包括藍綠尖頭葉蟬 (*Graphocephala atropunctata*)[63]、褐透翅尖頭葉蟬 (*Homalodisca coagulata*)[7]、綠尖頭葉蟬(*Draeculacephala minerva*)[53]與紅尖頭葉蟬(*Carneocephala fulgida*)[30]等 4 種，以及 1 種沫蟬總科(Cercopoidea)之尖胸沫

蟬科(Aphrophoridae)黃頭長沫蟬(*Philaenus spumarius*)，例如尖頭葉蟬(sharpshooter)被認為能傳播大部份或全部 *X. fastidiosa* 之菌株，而尖頭葉蟬之寄主範圍廣[2]，包括許多草本和木本植物，常年不斷之寄主及昆蟲季節遷移性，常導致中間寄主暴露於 *X. fastidiosa* 存在之威脅，因而引起病害之大量發生。而此病原菌在蟲體內最短潛伏期為二小時或更短且能在前腸(forgut)部位增殖，但不會藉由卵傳至下一代，成蟲吸取病菌能持續傳播病菌至死亡，而若蟲獲得病菌經蛻皮後即無法成功傳播病菌[65]。

梨葉緣焦枯病菌PCR鑑定與偵測技術

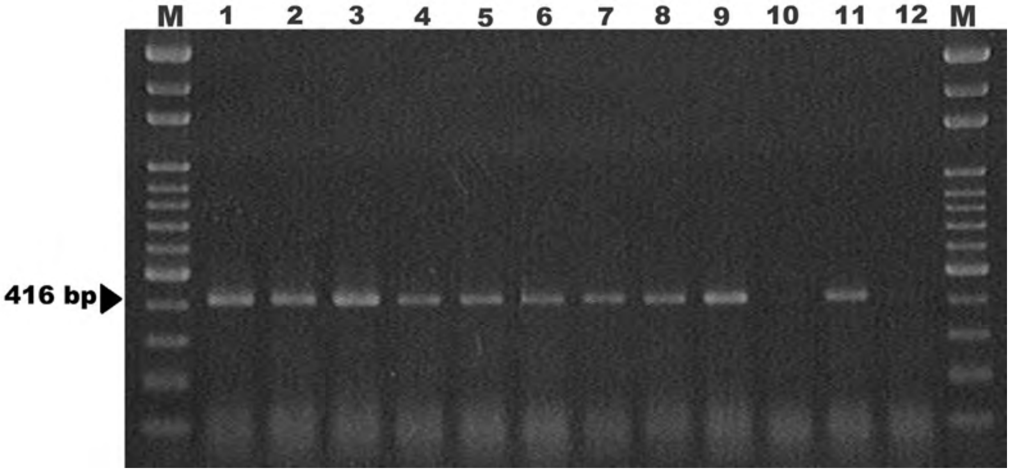
有關 *X. fastidiosa* 之鑑定與偵測，早期只能以特殊培養基培養、光學顯微鏡及電子顯微鏡切片觀察[8, 40]，但耗時費力。在 80 年代後血清學技術發展日益成熟普及，加上血清學技術可以改善檢測效率及大規模樣品快速檢測，普遍應用於 *X. fastidiosa* 病原菌檢測、流行病學調查及蟲媒偵測[6, 11, 57, 62, 73, 81]。近年分子生物學的鑑定技術如核酸探針(DNA probe)[71]、聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)[56]及隨機增幅核酸多型性分析(random amplified polymorphic DNA, RAPD)[80]等具有快速、專一性及高靈敏度之特性，廣泛應用於植物病原細菌之鑑定及偵測，其中 PCR 技術普遍應用於 *X. fastidiosa* 之檢測[52, 59, 61, 62]，甚至有些已開發專一性引子對可鑑別來自不同寄主植物之 *X. fastidiosa* 菌株菌群[4, 60]。

目前 *X. fastidiosa* 菌株可依交叉接種試驗資料可分為幾個菌群，例如來自於許多寄主植物之 PD 菌群、來自柑橘及咖啡菌株之 CVC 菌群及來自桃與李所分離的菌株群[66]。不同菌群目前已有開發鑑別性引子對進行鑑定，例如 Pooler 和 Hartung[60]利用 RAPD 產物發展 PCR 引子對(CVC-1/272-2-int)，以區分 *X. fastidiosa* 中的 CVC 菌群和非 CVC 菌群的菌株；Banks 等人[4]也以 RAPD 技術發展引子對(XF176f/XF686r)可專一性鑑別 PD 菌群之菌株。

早期利用國外已設計 *X. fastidiosa* 廣效性引子對 RST31/RST33[52]及 272-1-int/272-2-int[60]測試來自國內 8 個橫山梨產區之 30 個梨葉緣焦枯病菌

株皆無法增幅出預期之基因產物片段，而過去的研究亦指出梨葉緣焦枯病菌與其他寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株無血清相關性[46, 48]，此等結果意謂著梨葉緣焦枯病菌菌株與其他寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株在基因層次之親緣性有明顯差異。利用隨機引子 OPA11 進行 RAPD 分析，選殖獲得梨葉緣焦枯病菌之 1,412 bp 大小 DNA 片段，核苷酸序列中 494-1,412 bp 與目前線上基因庫已註冊 DNA 序列之相似度皆高於 85%以上，而 1-493 bp 與目前線上基因庫已註冊 DNA 序列之相似度皆低於 10%，因此，1~493 bp 為梨葉緣焦枯病菌共有之特異性核苷酸序列，從中設計獲得 1 組引子對 PLS-F(5'-TGGACGTTGTGGTATCGGTG-3') / PLS-R(5'-TTGAAGTTGACGTGTGGCTG-3') (圖三)，此引子對只對梨葉緣焦枯病菌菌株可增幅 416 bp 大小基因產物，其他 7 種寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株及一般植物病原細菌皆無基因產物，同時 PCR 黏合溫度測試更可高達 67℃，顯示設計之引子對 PLS-F/PLS-R 對梨葉緣焦枯病菌菌株具有高度專一性，引子對可成功檢測田間採集的罹病梨樹組織(圖四)，此引子對有潛力應用在梨葉緣焦枯病之罹病組織、蟲媒及中間寄主等方面之病原菌偵測[76]。

圖三、選殖株重組質體 OPA11-1400 嵌入 DNA 片段之部分 540 bp (1-540)核苷酸序列及引子對 PLS-F (31-50) / PLS-R (427-456)之 20 bp 核苷酸序列。
Fig. 3. The 540 bp (1-540) partial nucleotide sequence selected from the inserted DNA fragment in recombinant plasmid OPA 11-1400 and the 20 bp nucleotide sequences of primer of PLS-F (31-50) / PLS-R (427-456).



圖四、利用引子對 PLS-F/PLS-R 進行聚合酵素連鎖反應偵測田間不同罹病梨樹組織內之梨葉緣焦枯病病菌。

Fig. 4. Detection of pear leaf scorch bacteria (PLSB) of diseased tissues from different pear trees in fields by polymerase chain reaction with primer pair PLS-F/PLS-R. M: Gen-100 DNA Ladder (GeneMark, Taiwan); Lanes 1-9: samples from different pear diseased trees; Lane 10: healthy tissue; Lane 11: total DNA of PLSB as positive control; Lane 12: ddH_2O as negative control.

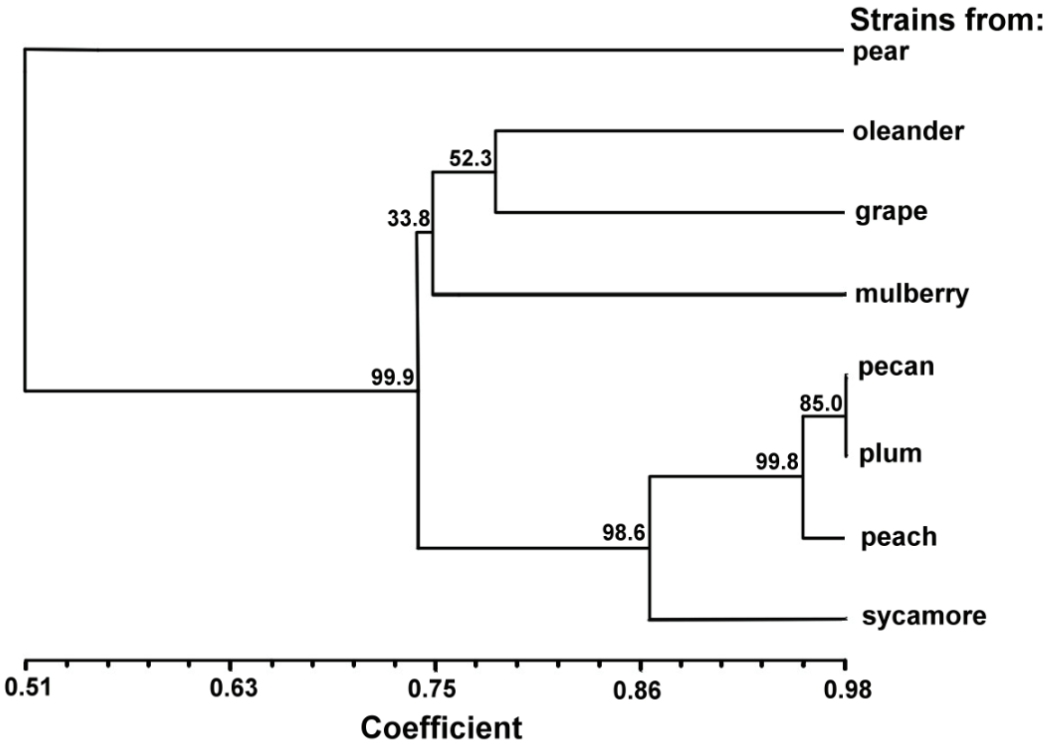
梨葉緣焦枯病菌與其他寄主植物來源菌株之親緣關係

X. fastidiosa 為寄主範圍廣之植物病原細菌，主要分佈於美洲地區，近年來美洲地區的 *X. fastidiosa* 菌株以 RAPD、ERIC-PCR 及 16S rDNA 等分子技術分析，可將不同寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株區分為不同菌群[1, 14, 15, 16, 17, 27, 43, 51, 60, 67, 70]，而不同菌群間似乎皆存有病原性、培養特性及分子特徵差異性。有些學者推測不同 *X. fastidiosa* 菌群的形成可能與寄主植物之特化性有關[35, 37, 40]。

應用 RAPD、ERIC-PCR 及 BOX-PCR 三種 DNA 指紋圖譜及親緣樹狀圖分析結果發現國內梨葉緣焦枯病菌為獨立菌群，與其他 7 種寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株親緣相關性低，這些差異性顯示台灣梨葉緣焦枯病菌是 *X. fastidiosa* 菌群中一獨立菌群，而 7 種其他寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株彼此間

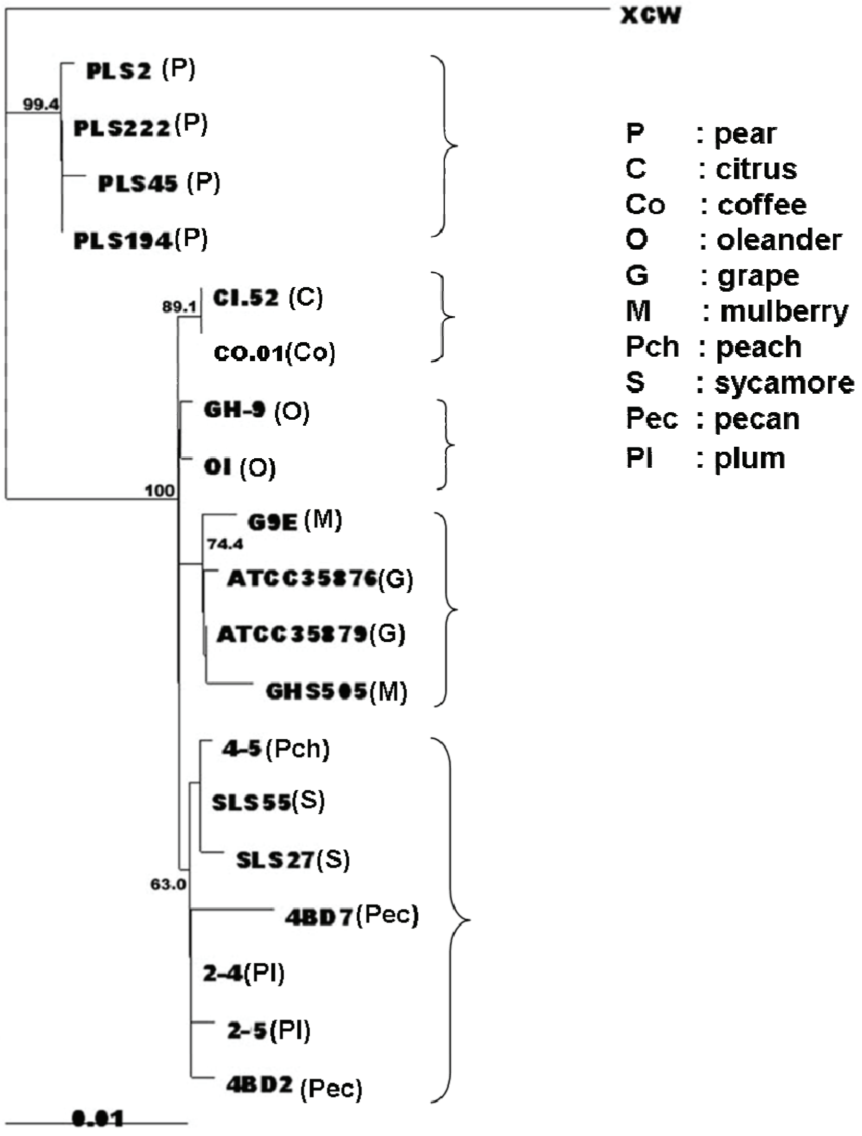
有親緣相關性 (coefficient＞0.70)，可區分為 3 個菌群，分別為：(1)夾竹桃及葡萄菌群、(2)桑椹菌群及(3)胡桃樹、李樹、桃樹及無花果菌群(圖五)[75]，此結果與國外文獻報導相似，例如 Pooler 等人以 RAPD 技術將測試 7 種寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株區分為 5 群[60]，分別為：(1)柑橘菌群、(2)李及榆樹菌群、(3)葡萄及豬草(ragweed)菌群、(4)杏仁菌群及(5)桑椹菌群；Qin 等人[67]利用 ERIC-PCR 及 RAPD 技術對來自北美地區及南美地區共 9 個不同寄主植物 57 個 *X. fastidiosa* 菌株進行比較分析，可將試驗菌株區分為北美 7 種寄主植物菌群及南美柑橘及咖啡菌群，其中北美菌群可細分為 3 個菌群，分別為：(1)桑椹菌群、(2)葡萄、豬草及杏仁菌群及(3)榆樹、橡樹及李樹菌群。另由三種 DNA 指紋圖譜技術分析結果示國內 8 個橫山梨產區之 30 個梨葉緣焦枯病菌菌株間無差異性，彼此間具同源性，此結果顯示國內不同地區之梨葉緣焦枯病菌菌株可能來自於同一起源。

筆者進一步分析梨葉緣焦枯病菌及來自於 9 種其他寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株之 16S rRNA 基因及 16S-23S rRNA 基因區間序列，根據樹型關係遠近皆可將 10 種寄主植物 *X. fastidiosa* 區分為 2 群分別為梨葉緣焦枯病菌菌群及其他寄主植物 *X. fastidiosa* 菌群，這 2 群 bootstrap 值都在 90％以上，其他寄主植物 *X. fastidiosa* 菌群中可再細分為 4 個次菌群分別為：(1)夾竹桃菌群、(2)葡萄與桑椹菌群、(3)咖啡與柑橘菌群及(4)胡桃樹、李樹、桃樹及無花果菌群(圖六及圖七)。其中葡萄菌系，柑橘菌系，李樹、桃樹及無花果菌系分析結果皆分別符合 Schaad 等人定義的 3 個亞種，但梨葉緣焦枯病菌菌群與其他寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株間於 16S-23S rRNA 基因區間序列分析相似值介於 87.4~87.6％遠低於 *X. fastidiosa* 3 個亞種間相似值介於 97.9~99.2％[72]；另 Mehta 和 Rosato[51]研究中亦發現梨葉緣焦枯病菌(1 個菌株由筆者提供)與柑橘 *X. fastidiosa* 菌株進行 DNA-DNA 雜合試驗(hybridization)，彼此間為同源性低於 20％，綜合過去研究資料及筆者分析結果，推論台灣梨葉緣焦枯病菌菌群與其他寄主植物 *X. fastidiosa* 菌群間應為亞種以上的層級差異或可提升為 *Xylella* 屬中一新種。



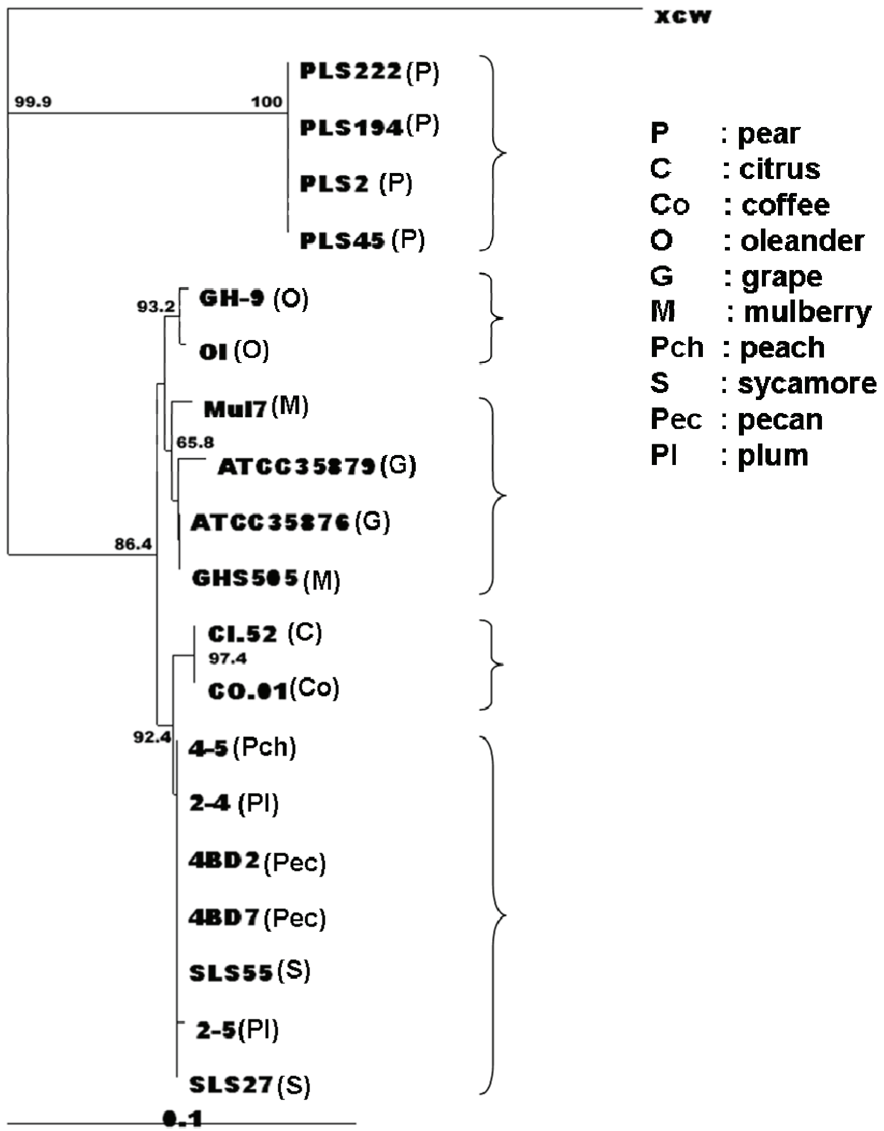
圖五、分析梨葉緣焦枯病菌與國外不同寄主植物 *Xylella fastidiosa* 菌株之 RAPD、ERIC-PCR 及 BOX-PCR DNA 指紋圖譜條帶，並經由 NTSYS-pc version 2.0 電腦軟體中的 UPGMA 程式繪製相似值樹狀圖。另由 WinBoot 程式計算出各群集之信賴界限，標示於親緣樹狀圖中各群集之轉折點。

Fig. 5. A dendrogram showing the genetic relationships between strains of pear leaf scorch bacterium and strains of *Xylella fastidiosa* from other hosts based on DNA fingerprintings generated by RAPD、ERIC-PCR and BOX-PCR. Data were analyzed by NTSYS-pc version 2.0 using unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) and confirmed by bootstrapping using WinBoot program.



圖六、梨葉緣焦枯病菌與其他寄主植物 *Xylella fastidiosa* 之 16S rRNA 基因序列經由 Neighbor-joining (NJ) 方法分析親緣演化樹；枝條上的數字代表 boostrap 值。

Fig. 6. A phylogenetic tree produced with the Neighbor-joining method based on the 16S rRNA gene sequences of pear leaf scorch bacteria and strains of *Xylella fastidiosa* from other hosts. The Numbers at the selected nodes indicate the levels of bootstrap support (percentage) based on 1000 re-sampled data sets (only values greater than 60％ shown). The scale bar represents 1％ of sequence divergence.



圖七、梨葉緣焦枯病菌與其他寄主植物 *Xylella fastidiosa* 之 16S-23S rRNA 基因區間序列經由 Neighbor-joining (NJ) 方法分析親緣演化樹;枝條上的數字代表 boostrap 值。

Fig. 7. A phylogenetic tree produced with the Neighbor-joining method based on the 16-23S rRNA intergenic spacer of pear leaf scorch bacteria and strains of *Xylella fastidiosa* from other hosts. The Numbers at the selected nodes indicate the levels of bootstrap support (percentage) based on 1000 re-sampled data sets (only values greater than 60% shown). The scale bar represents 1% of sequence divergence.

梨葉緣焦枯病防治策略

X. fastidiosa 引起了許多植物之病害，除少數病害像 PD 病害和 phony peach disease 外，大部分皆被認定為較弱之病菌，許多 *X. fastidiosa* 之菌株引起之病害常為慢性衰弱或無表現病徵之狀態存在，病菌長久棲息聚集在導管，當寄主弱勢或環境壓力不利寄主，才明顯表現出病徵，包括乾旱、其他複合病害、機械性斷根、過度生產、果實熟化和生理老化(34, 41)，許多寄主直至果實成熟或晚秋生理老化，病徵才表現，另外生理老化實際影響寄主黃化、落葉及葉柄尖化病徵之表現。

梨葉緣焦枯病田間觀察亦顯示樹木年老衰落，長久缺水及過量生產及土壤惡化等因素下較容易表現出病徵，因此規劃合理管理栽培制度可適度減輕病株之嚴重度，而維持其基本生產力應可期待。化學治療方面，PD 病害和 plum leaf scald 均顯示注射四環黴素能減輕病勢之發展及病徵之表現(13, 38)，臺灣梨葉緣焦枯病每年 5 月和 10 月各注射四環黴素亦顯示能恢復樹勢之活力，同時注射後病株之徒長枝數較無注射之病株有明顯之增加(48)，然此法治標不治本，只能暫時降低病株病菌之族群，假如能配合增施優良有機肥或其他管理措施，將能增加植物之抵抗性，提高防治之效益，藥劑之注射時機應選在病株內細菌族群將增加之 5 月及病菌族群達高峰之 10 月，因 5 月果實漸成熟導致病徵逐漸呈現和 10 月梨樹生理老化會加速落葉影響光合作用減少樹液之回流，選擇此二階段注射藥劑，應是最理想之用藥時機。綜合前面所述擬定梨葉緣焦枯病之防治策略，其方法如下：

1. 禁止從病株採穗或枝條供繁殖用。
2. 嚴重之病株應砍除，同時不具生產力之小樹如罹病亦應立即淘汰。
3. 部份具病徵之成樹枝幹必須鋸除。
4. 定期噴灑殺蟲劑消滅田間蟲媒及鏟除中間寄主植物如雜草(待深入探討證實？)。
5. 輕微病株在 5 月及 10 月注射四環黴素。
6. 梨果收獲後增施發酵充份之優良有機肥。
7. 果園充份施水，防止乾旱發生。

結　論

X. fastidiosa 為國際重要檢疫病原細菌，可為害許多經濟作物，造成重大經濟損失，例如 PD 於 1892 年首次發現在美國加州南部地區[36]，爾後被命名為加州葡萄病(Califonia vine disease)，至今一直是美國東南地區葡萄產區之風土病 (endemic)，亦為該地區葡萄產業之主要限制因子，影響釀酒工業之葡萄栽培及生產甚鉅，PD 亦發現在中美洲和南美州地區造成危害，除美洲地區外，歐盟國家如南斯拉夫 Kosova 地區為首次被記錄 PD 危害之地區[5];PD 在加州許多葡萄栽植區域之葡萄園每年皆會發生，在 Napa、Sonoma 及 Mendocina 等郡之商業化栽植之葡萄園皆嚴重發生，一般認為該區域 PD 之流行發生與其蟲媒族群之建立有密切關係[64]。PD 亦會影響畜牧之產業，PD 之病原會引起苜蓿矮化病，造成苜蓿之嚴重減產[31]。PD 在加州曾藉由人為攜入而發生，本病可能廣泛分佈於加州地區或其他國家葡萄產區而未被發現，主要受限於該區域之寄主範圍仍未完全被發現及各國間進一步檢測 PD 存在之計畫仍未完全實行。本文詳細論述台灣梨葉緣焦枯病徵學、病原菌特性、PCR 鑑定與偵測技術、梨葉緣焦枯病菌與其他寄主植物來源菌株之親緣關係及防治策略，期望國內梨產業生產者瞭解本病生態學基本資料，能有效降低病害發生，但有關本病之蟲媒及中間寄主植物資料仍欠缺，未來企盼會引起許多學者興趣，深入此課題領域之研究；另本文論述 *X. fastidiosa* 菌株之 PCR 相關鑑定技術亦可提供動植物防檢局進行實務檢疫上之應用，防杜國外其他寄主植物 *X. fastidiosa* 菌株可能藉由種苗植物入侵台灣之風險。

引用文獻

1. Albibi, R., Chen, J., Lamikanra, O., Banks, D., Jarret, R. L., and Smith, B. J. 1998. RAPD fingerprinting *Xylella fastidiosa* Pierce’s disease strains isolated from vineyard in North Florida. FEMS Microbiol. Letters 165:347-352.

2. Aldlerz, W. C. 1980. Ecological observation on two leaf hopper that transmit the Pierce's disease bacterium. Proc. Fla. State Hortic. Soc. 93:115-120.
3. Anderson, P. C., and French, W. J. 1987. Biophysical characteristics of peach trees infected white phony peach disease. Physiol. M. L. Plant Pathol. 31:25-40.
4. Banks, D., Albibi, R., Chen, J., Lamikanra, O., Jarret, R. L., and Smith, B. J. 1999. Specific detection of *Xylella fastidiosa* Pierce's disease strains. Curr. Microbiol. 39:85-88.
5. Berisha, B., Chen, Y. D., Zhand, G. Y. and Chen, T. A. 1998. Isolation of Pierce's disease bacteria from grapevines in Europe. Eur. J. Plant Pathol. 104:427-433.
6. Brlansky, R. H., Lee, R. F., Timmer, L. W., Purcifull, D. E., and Raju, B. C. 1982. Immunofluorescent detection of xylem-limited bacteria *in situ*. Phytopathology 71:1444-1448.
7. Brlansky, R. H., Timmer, L. W., French, W. J., and McCoy, R. E. 1983. Colonization of the sharpshooter vectors, *Oncometopia nigricans* and *Honalodisca coagulata*, by xylem-limited bacteria. Phytopathology 73:530-535.
8. Chagas, C. M., Rossetti, V., and Beretta, J. G. 1992. Electron microscopy studies of a xylem-limited bacterium in sweet orange affected with citrus variegated chlorosis disease in Brazil. J. Phytopathol. 134:306-312.
9. Chang, C. J., and Donaldson, R. C. 1993. *Xylella fastidiosa*: cultivation in chemically defined medium. Phytopathology 83:192-194.
10. Chang, C. J., and Walker, J. T. 1988. Bacterial leaf scorch of northern red oak: isolation, cultivation, and pathogenicity of a xylem-limited bacterium. Plant Dis. 72:730-733.
11. Chang, C. J., Garnier, M., Zreik, L., Rossetti, V., and Bove, J. M. 1993. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing

citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. Curr. Microbiol. 27:137-142.
12. Chang, C. J., Robacker, C. D., and Lane, R. P. 1990. Further evidence for the isolation of *Xylella fastidiosa* on nutrient agar from grapevines showing Pierce's disease symptoms. Can. J. Plant Pathol. 12:405-408.
13. Chang, C. J., Yonce, C. E., and Gardner, D. 1987. Suppression of leaf scald symptom in plum by oxytetracycline injection. Ann. Phytopath. Soc. Japan 53:354-359.
14. Chen, J., Banks, D., Jarret, R. L., Chang, C. J., and Smith, B. J. 2000. Use of 16S rDNA sequences as signature characters to identify *Xylella fastidiosa*. Curr. Microbiol. 40:29-33.
15. Chen, J., Chang, C. J., Jarret, R. L., and Gawel, L. 1992. Genetic variation among *Xylella fastidiosa* strains. Phytopathology 82:973-977.
16. Chen, J., Hartung, J. S., Chang, C. J., and Vidaver, A. K. 2002. An evolutionary perspective of Pierce's disease of grapevine, citrus variegated chlorosis, and mulberry leaf scorch diseases. Curr. Microbiol. 45:423-428.
17. Chen, J., Jarret, R. L., Qin, X., Hartung, J. S., Banks, D., Chang, C. J., and Hopkins, D. L. 2000. 16S rDNA sequence analysis of *Xylella fastidiosa* strains. System. Appl. Microbiol. 23:349-354.
18. Davis, M. J., and Purcell, A. H. 1978. Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. Science 199:75-77.
19. Davis, M. J., French, W. J., and Schaad, N. W. 1981. Axenic culture of the bacteria associated with phony disease of peach and plum leaf scald. Curr. Microbiol. 6:309-314.
20. Davis, M. J., Purcell, A. H., and Thomson, S. V. 1980. Isolation medium for the Pierce's disease bacterium. Phytopathology. 70:425-429.
21. de Lima, J. E. O., Miranda, V. S., Hartung, J. S., Brlansky, R. H., Coutinho, A., Roberto, S. R., and Carlos, E. F. 1998. Coffee leaf scorch bacterium: Axenic culture, pathogenicity, and comparison with *Xylella fastidiosa* of

citrus. Plant Dis. 82:94-97.
22. Evert, D. R. 1987. Influence of phony disease of peach on stem hydraulic conductivity and leaf xylem pressure potential. J. Amer. Soc. Hortic. Sic. 112:1032-1036.
23. French, W. J., and Stassi, D. L. 1978. Response of phony-infected peach trees to gibberellic acid. Hort. Sci. 13:158-159.
24. Fry, S. M., Milholland, R. D., and Huang, P. Y. 1990. Isolation and growth of strains of *Xylella fastidiosa* from infected grapevines on nutrient agar media. Plant Dis. 74:522-524.
25. Goheen, A. C., Nyland, G., and Lowe, S. K. 1973. Association of a rickettsia-like organism with Pierce's of grapevines and alfalfa dwarf and heat therapy of the disease in grapevines. Phytopathology 63:341-345.
26. Hearon, S. S., Sherald, J. L., and Kostka, S. J. 1980. Association of xylem-limited bacteria with elm, sycamore and oak leaf scorch. Can. J. Bot. 58:1986-1996.
27. Hendson, M., Purcell, A. H., Chen, D., Smart, C., Guilhabert, M., and Kirkpatrick, B. 2001. Genetic diversity of Pierce's disease strains and other pathotypes of *Xylella fastidiosa*. Appl. Environ. Microbiol. 67:895-903.
28. Hewitt, W. B., and Houston B. R. 1941. Association of Pierce's disease of grapevine and alfalfa dwarf in California. Plant Dis. Rep. 25:475-476.
29. Hewitt, W. B., Frazier, N. W., and Houston, B. R. 1942. Transmission of Pierce's disease of grapevines with leaf hopper. (Abstr.) Phytopathology 32:8.
30. Hewitt, W. B., Frazier, N. W., Jacob, H. E., and Freytag, J. H. 1942. Pierce's disease of grapevines. Calif. Agric. Exp. Stn. Circ. 353: 1-32.
31. Hewitt, W. B., Houston B. R., Frazier, N. W., and Freitag, J. H. 1946. Leafhopper transmission of the virus causing Pierce's disease of grape and dwarf of alfalfa. Phytopathology 36:117-128.
32. Hewitt, W. B., Houston, B. R., Frazier, N. W., and Freitag, J. H., 1946.

Pierce’s disease of grapevine. Calif. Agric. Exp. Stn. Circ. 353:1-32.

33. Hopkins, D. L. 1981. Seasonal concentration of the Pierce’s disease bacterium in grapevine stems petioles, and leaf veins. Phytopathology 71:415-418.
34. Hopkins, D. L. 1985. Effects of plant growth regulators on development of Pierce’s disease symptoms in grapevine. Plant Dis. 69:944-946.
35. Hopkins, D. L. 1989. *Xylella fastidiosa*: xylem-limited bacterial pathogen of plants. Annu. Rev. Phytopathol. 27:271-290.
36. Hopkins. D. L. 2001. Pierce’s disease. In: *Encyclopaedia of Plant Pathology Volume II*, Maloy, O.C. and Murray, T.D.(eds), John Wiley and Sone Inc., New York, pp71-772.
37. Hopkins, D. L., and Adlerz, W. C. 1988. Natural hosts of *Xylella fastidiosa* in Florida. Plant Dis. 72:492-431.
38. Hopkins, D. L., and Mollenhauer, H. H. 1973. Rickettsia-like bacterium associated with Pierce’s disease of grapes. Science 179:298-300.
39. Hopkins, D. L., and Mortensen, J. A. 1971. Suppression of Pierce’s disease symptoms by tetracycline antibiotics. Plant Dis. Rep. 55:610-612.
40. Hopkins, D. L., and Purcell, A. H. 2002. *Xylella fastidiosa* : cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. Plant Dis. 86: 1056-1066.
41. Hopkins, D. L., and Thompson, C. M. 1984. Seasonal concentration of Pierce’s disease bacterium in “Carlos” and “Welder” muscadine grape compared with “Schuyler” bunch grape. Hort. Science 19:419-420.
42. Houston, B. R., Frazier, N. W., and Hewitt, W. B. 1942. Leaf-hopper transmission of the alfalfa dwarf virus. (Abstr.) Phytopathology 32:10.
43. Kamper, S. M., French, W. J., and Dekloet, S. R. 1985. Genetic relationships of some fastidious xylem-limited bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 35:185-188.
44. Kostka, S. J., Tattar, T. A., Sherald, J. L., and Hurtt, S. S. 1986. Mulberry

leaf scorch, a new disease caused by a fastidious xylem-inhabiting bacterium. Plant Dis. 70:690-693.

45. Lee, R. F., Raju, B. C., Nyland, G., and Goheen, A. C. 1982. Phytotoxin(s) produced in culture by the Pierce's disease bacterium. Phytopathology 72:886-888.
46. Leu, H. H., Leu, L. S., and Lin, C. P. 1998. Development and application of monoclonal antibodies against the causal bacterium of pear leaf scorch, *Xylella fastidiosa*. J. Phytopathol. 146:31-37.
47. Leu, L. S., and Su, C. C. 1990. Preliminary report on pear leaf scorch induced by xylem-limited bacteria in Taiwan. (Abstr.) Plant Prot. Bull. 32:329.
48. Leu, L. S. and Su, C. C. 1993. Isolation, cultivation, and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. Plant Dis. 77:642-646.
49. Liaw, W. J. 2005. The development of pear cultivation technique in Taiwan. p.47-54. Proceedings of a Symposium on Cultural Techniques and Management in Pear. 510pp. (in Chinese).
50. Lin, J. H., Liaw, W. J., Lin, H. S., and Chang, L. R. 1991. The review and outlook of pear cultivation in Taiwan. p.379-396. Proceeding of A Symposium on Fruit Production, Research and Development in Taiwan. 429pp. (in Chinese).
51. Mehta, A. and Rosato, Y. B. 2001. Phylogenetic relationships of *Xylella fastidiosa* strains from different hosts, based on 16S rDNA and 16-23S intergenic spacer sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:311-318.
52. Minsavage, G. V., Thompson C. M., Hopkins, D. L., Leite, R. M. V. B. C., and Stall, R. E. 1994. Development of polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. Phytopathology 84:456-461.
53. Mircetich, S. M., Lowe, S, K., Moller, W. J., and Nyland, G. 1976. Etiology

of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. Phytopathology 66:17-24.

54. Mollenhauer, H. H., and Hopkins, D. L. 1974. Ultrastructural study of Pierce’s disease bacterium in grape xylem tissue. J. Bacteriol. 119:612-618.
55. Mollenhauer, H. H., and Hopkins, D. L. 1976. Xylem morphology of Pierce’s disease-infected grapevines with different levels of tolerance. Physiol. Plant Pathol. 9:95-100.
56. Mullis, K. B., and Falloona, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. Methods Enzymol. 155:335-350.
57. Nomé, S. F., Raju, B. C., Goheen, A. C., Nyland, G., and Docampo, D. 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay for Pierce’s disease bacteria in plant tissues. Phytopathology 70:746-749.
58. Nyland, G., Goheen, A. C., Lowe, S. K., and Kirkpatrick, H. C. 1973. The ultrastructure of a rickettsia-like organism from a peach tree affected with phony disease. Phytopathology 63:1275-1278.
59. Oliveira, A. C., Vallim, M. A., Semighini, C. P., Araújo, W. L., Goldman, G. H., and Machado, M. A. 2002. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by real-time polymerase chain reaction assay. Phytopathology 92:1048-1054.
60. Pooler, M. R., and Hartung, J. S. 1995. Genetic relationships among strains of *Xylella fastidiosa* from RAPD-PCR data. Curr. Microbiol. 31:134-137.
61. Pooler, M. R., and Hartung, J. S. 1995. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* strains causing citrus variegated chlorosis. Curr. Microbiol. 31:377-381.
62. Pooler, M. R., Myung, A. S., Bentz, J., Sherald J., and Hartung J. S. 1997. Detection of *Xylella fastidiosa* in potential insect vector by immunomagnetic separation and nested polymerase chain reaction. Letters Appl. Microbiol. 25:123-126.

63. Purcell, A. H. 1975. Role of the bluegreen sharpshooter, *Hordnia circellata*, in the epidemiology of Pierce's disease of grapevines. Environ. Entomol. 4: 745-752.
64. Purcell, A. H. 2000. Glassy-winged sharpshooter (*Homalodisca coagulata*) http://nature.berkeley.edu/xylella/oss.html
65. Purcell, A. H., and Finlay, A. H. 1979. Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leaf hoppers. Phytopathology 69:393-395.
66. Purcell, A. H., and Hopkins, D. L. 1996. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 34:131-151.
67. Qin, X., Miranda, V. S., Machado, M. A., Lemos, E. G. M., and Hartung, L. S. 2001. An evaluation of the genetic diversity of *Xylella fastidiosa* isolated from diseased citrus and coffee in São Paulo, Brazil. Phytopathology 91:599-605.
68. Raju, B. C., and Wells, J. M. 1986. Disease caused by fastidious xylem-limited bacteria and strategies for management. Plant Dis. 70:182-186.
69. Raju, B. C., Wells, J. M., Nyland, G., Brlansky, R. H., and Lowe, S. K. 1982. Plum leaf scald: isolation, culture, and pathogenicity of the causal agent. Phytopathology 72:1460-1466.
70. Rosato, Y. B., Neto, J. B., Miranda, V. S., Carlos, E. F., and Manfio, C. P. 1998. Diversity of a *Xylella fastidiosa* population isolated from *Citrus sinensis* affected by citrus variegated chlorosis in Brazil. System. Appl. Microbiol. 21:593-598.
71. Schaad, N. W., Cheng, S. S., Tamski, S., Hatziloukas, E., and Panopoulos, N. J. 1995. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* by DNA hybridization probe. Phytopathology 79:903-907.
72. Schaad, N. W., Postnikova, E., Lacy, G., Fatmi, M., and Chang, C. J. 2004. *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei*, subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., and *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. Syst. Appl. Microbiol. 21:290-300.

73. Sheraid, J. L., and Lei, J. D. 1991. Evaluation of a rapid ELISA test kit for detection of *Xylella fastidiosa* in landscape. Plant Dis. 75:200-203.
74. Su, C. C. and Leu, L. S. 1995. Distribution of pear leaf scorch and monthly isolation of its causal organism, *Xylella fastidiosa* from infected trees. Plant Pathol. Bull. 4:30-33.
75. Su, C. C., Yang, W. J., Feng, C. Y., Hsu, S. T., and Tzeng, K. C. 2008. The application of DNA fingerprintings amplified by arbitrary primers in differentiating pear leaf scorch bacterium from other *Xylella fastidiosa* strains. Plant Pathol. Bull. 17: 261-269.
76. Su, C. C., Yang, W. J., Hsu, S. T., and Tzeng, K. C. 2008. Specific detection of *Xylella fastidiosa* strains causing pear leaf scorch by polymerase chain reaction. Plant Pathol. Bull. 17: 183-194.
77. Wells, J. M., Raju, B. C., and Nyland, G. 1983. Isolation, culture, and pathogenicity of the bacterium causing phony disease of peach. Phytopathology 73:859-862.
78. Wells, J. M., Raju, B. C., Hung, H. Y., Weisburg, W. G., Mandelco-Paul, L., and Brenner, D. J. 1987. *Xylella fastidiosa* gen. nov. sp. nov.: Gram-negative xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomaonas* spp. Int. J. syst. Bacteriol. 36:136-143.
79. Wells, J. M., Raju, B. C., Nyland, G., and Lowe, S. K. 1981. Medium for isolation and growth of bacteria associated with plum leaf scald and phony peach diseases. Appl. Environ. Microbiol. 42:357-363.
80. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.
81. Yonce, C. E. and Chang, C. J. 1987. Detection of xylem-limited bacteria from sharpshooter leafhoppers and their feeding hosts in peach environs monitored by culture isolations and ELISA techniques. Environ. Entomol. 16:68-71.

ABSTRACT

Pear leaf scorch

Su, C. C.[1, 3], Feng, C. Y.[1], Kao, C. W.[1], Tzeng, K. C.[2], and Hsu, S. T.[2]

[1] Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Reasearch Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan, Thaichung, Wu-feng 413, Taiwan, R.O.C.

[2] Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.

[3] Corresponding author, Email: auba@tactri.gov.tw

Pear leaf scorch (PLS) disease, the only *Xylella fastidiosa*-induced disease reported from Taiwan, is commonly found in areas where the variety Hengshan (*Pyrus pyrifolia*) is grown. Strains of PLS bacterium shares similarities to strains of *X. fastidiosa* from other host origins in the requirement of complex medium and the rippled cell wall in cell structure. However, PLS strains are not serologically related to strains of *X. fastidiosa* from other hosts. Likewise, no DNA fragment was amplified from PLS strains with two general primer sets of RST31/RST33 and 272-int/272-int-2 used to detect strains of *X. fastidiosa* from other hosts. A fragment of 1412 bp in size amplified for PLS strains with a random primer OPA11 by random amplified polymorphic DNA(RAPD) technique was identified as specific for PLS strains. A set of specific primer PLS-F/PLS-R amplified a 416 bp fragment was designed from the sequence data for PLS strains. The PLS bacterium could be detected by using the specific primer set in PLS diseased leaf tissues collected from fields.The DNA fingerprintings generated by RAPD-PCR, enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR) and BOX-PCR of all strains of *X. fastidiosa* from eight hosts. The constructed dendrograms showed that all strains of PLS bacterium were clusted together and separate from other *X. fastidiosa* strains, and the latter wereclustered into three groups: one consisted of mulberry strains, another consisted of grape and oleanderstrains, and the third comprised pecan, plum, peach and sycamore strains. Our results indicate that the DNA

fingerprintings amplified by arbitrary primers are useful to differentiate pear leaf scorchbacteria from other *X. fastidiosa* strains. Further compared the phylogenetic relationship based on 16S rRNA sequence and 16S-23S rRNA spacer region of various strains from ten hosts using neighbor joining method. All strains of *X. fastidiosa* from different host were distinguished two groups, pear group and other host group. The other host group were subdivided into four subgroup: (1)oleander, (2)grape and mulberry, (3)citrus and coffee, and (4) pecan, peach, plum and sycamore. According to the above 16S rRNA sequence and 16S-23S rRNA spacer region data, pear leaf scorch strains were much low homology in comparison with strains of X. fastidiosa from other host and induced disease which only reported in Taiwan. We postulated pear leaf scorch strains could be a new subspecies or species within the genera of *Xylella*. The developed PCR identified techniques of *X. fastidiosa* could be a useful tool for rapid detection of PLS bacterium in insect vectors and alternative hosts in Taiwan in the future. The rational cultural pratices, such as roguing diseased plant, avoiding bud or cutting from infected trees for vegetable reproduction and increasing amendments of organic matters, could alleviate disease symptoms. Injection of oxytetracycline solution in May and October partially supressed disease development.

Key words： pear leaf scorch, *Xylella fastidiosa*, polymerase chain reaction, detection, genomic fingerprinting, 16S rRNA gene sequence, 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequence, phylogenetic relationship

利用產期調控與田間排水以管理茭白基腐病

黃晉興[1,3]、林益昇[2]、安寶貞[1]

[1] 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組

[2] 亞洲大學生物科技系

[3] 聯絡作者，電子郵件信箱：JHHuang@tari.gov.tw

摘　要

自 1999 年起，台灣南投縣栽培之茭白每年夏季均會發生由 *Pythiogeton zizaniae* 或 *Enterobacter cloacae* 所引起之基腐病（basal stalk rot 或 basal stem rot）。田間病害調查顯示，本病害主要發生於"早生青殼"品種之茭白，尤其在 7 月時最為嚴重，發病度可達 43.8%。該品種茭白栽培期為 12 月開始育苗種植至翌年 10 月，有兩次採筍期為 4-6 月及 7-10 月上旬，分別稱為第一與第二期筍，而基腐病主要減少第二期筍的產量。本研究指出不採收第一期筍或在第一期筍採收時全期排水，可降低基腐病的發生；若在採收第一期筍中末期（5-6 月）排水 30-40 天，雖對第一期筍的產量有輕微影響，但能降低基腐病的危害而減少第二筍期產量的損失。為確保第一期筍的產量，本研究亦提出茭白筍產期調節的方法，即提早 1 個月（於 11 月上旬）育苗種植，並在分蘖生長期間實施夜間照光以避免矮化症，則能使第一期筍提早於 4 月採收完畢，爾後排水則不影響第一筍期的產量。此外，若於排水期（5-6 月）將地上部枝葉全部割除，使分蘖苗重新長出，則發病度可低至 0.4%，顯著較僅排水處理組 9.1% 與慣行浸水對照組 13.2% 低。

關鍵詞：茭白、基腐病、亞腐霉菌、排水、矮化症

緒　言

茭白（*Zizania latifolia* (Griseb.) Turcz. ex Stapf., syn. *Zizania caduciflora*

Turcz.)，英文名為 water bamboo、water oat、Manchurian wild rice 與 Coba，是一種多年生宿根性草本水生植物（Terrell & Batra 1982，Thrower & Chan 1980），外觀似直立莖之構造為葉互生環抱而成之假莖，其莖部位於假莖下方，莖節及基部縮短莖可陸續長出側芽與分櫱苗而形成叢狀。茭白因受黑穗菌（*Ustilago esculenta* P. Henn.）寄生於莖部而使莖部細胞增殖膨大（Yang & Leu 1978，Chan & Thrower 1980，Thrower & Chan 1980），形似筍狀且具有食用價值，故稱茭白筍，英文名為 water shoot、Gausun 或 Kah Peh Sung（楊 1976，劉與郭 1976，鍾 1989）。

根據農糧署統計，民國 98 年台灣茭白筍栽種面積達 2,057 公頃，總收獲量為 46,169 公噸，總產值約新台幣 20.2 億元，以南投縣為主要產地，所種植茭白的面積及產量分別占全台灣 88.6% 與 94.6%。台灣目前主要茭白筍品種有 3 種，分別為“早生青殼”(Green Shell Early variety)、“紅殼”（Red Shell variety）與“白殼”（White Shell variety）(林 2005)，栽培數量以前者最多，次者少量，後者目前甚少栽培。“早生青殼”品種乃自以前的“青殼”品種（Green Shell variety）選育出園藝性狀較佳之品系，一年收獲兩季，適合於南投縣的環境栽培（林與洪 2000）。當地茭白筍栽培方式是採用一年生栽培，每年均須翻犁水田重新整地與育苗，栽培期為每年 12 月至翌年 10 月。於 12 月上旬取上季茭白植株基部之莖，於潮濕畦上育苗約 1 個月，次年 1 月再將茭白苗移植於水田，爾後全程浸水栽培。植株經多次分櫱而生長成叢狀，筍體大多於水中發育，並需要流動的灌溉水以維持產量與品質，於孕筍時期之水深 45-60 cm，4-6 月及 7-10 月上旬各有一次主要採收期(林 2005)，分別稱為第一及第二期筍。另一品種“赤殼”一年僅收獲一季，栽培期為 4 月至 11 月，於 5-6 月須割除老枝以促進分櫱與生長，每年僅於 9～11 月採收一期（林 2005）。

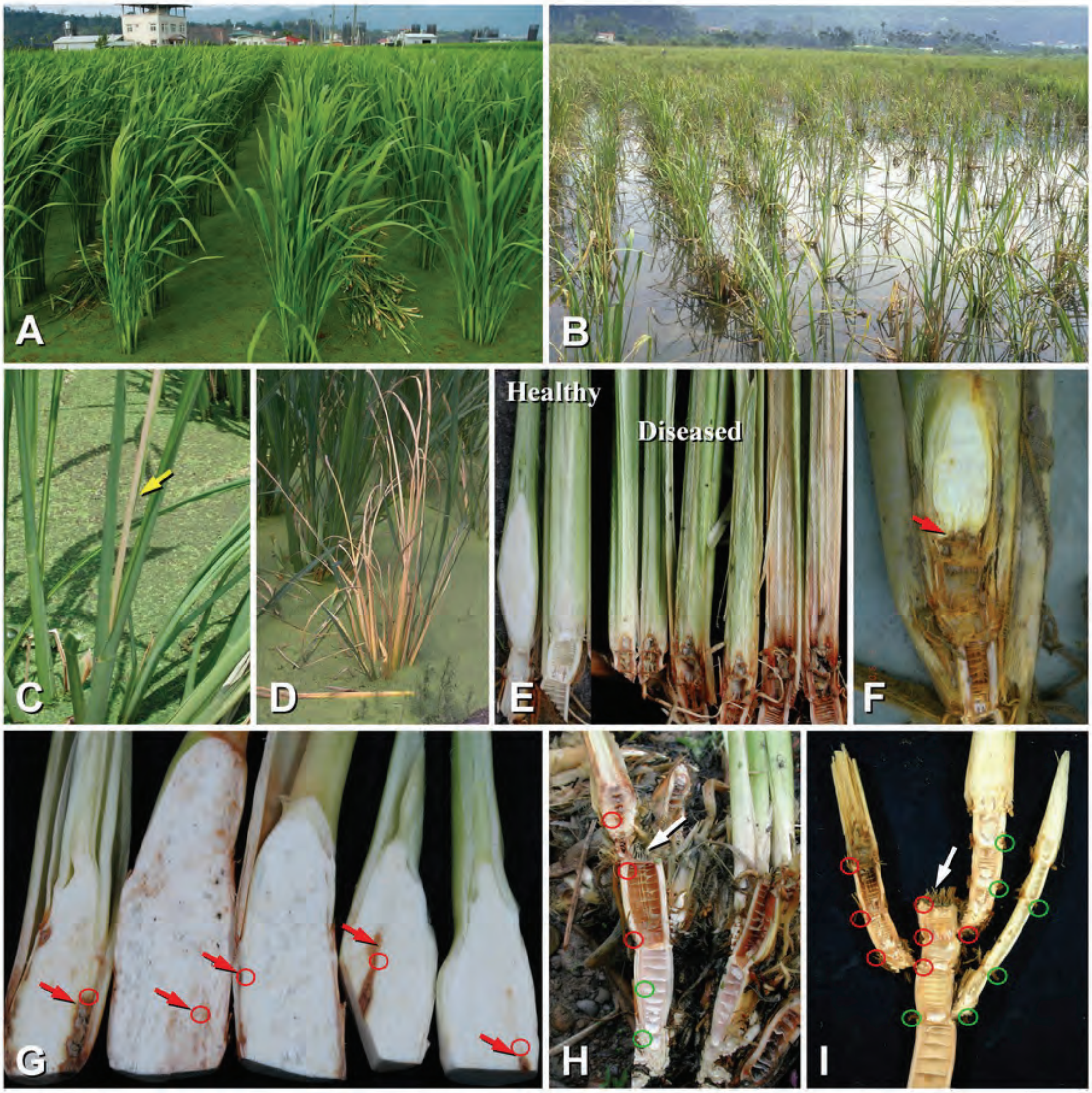
1999 年 6 月，南投縣埔里鎮及鄰近之魚池鄉的茭白筍首次發生一種以往未見的新病害，受害面積達數百公頃以上，使當年第二期筍嚴重減產，爾後每年夏季此病害持續發生並發病面積逐年增加，曾高達 1,000 公頃。無論幼苗或成株，罹病株之莖基部都會呈現褐化腐敗的現象。洪氏（洪 2002）與郭氏（郭 2004）報告細菌 *Enterobacter cloacae* 為其病原菌，並訂

名為「細菌性基腐病」(basal stem rot);然而同一時期,安等人(Ann et al. 2006)認為本病害之病原菌為 *Pythiogeton zizaniae* Ann & Huang,並訂名為「基腐病」(basal stalk rot)。由於本病害大面積且嚴重的發生,使整個南投縣茭白筍產業受到嚴重的打擊;本文主要敍述茭白基腐病的發生,及利用排水配合產期調控以進行基腐病的病害管理,除了文中另有敍述之外,均以種植最多的"早生青殼"品種為供試作物。

病害調查

在埔里鎮栽培茭白至夏季時,常可見植叢茂密(圖一 A),若發生嚴重的基腐病則會出現枝葉黃化、植叢稀疏(圖一 B),罹病株的外觀病徵初期為新葉呈淡綠色,爾後枯黃,外葉仍保持翠綠(圖一 C)。剖開罹病植株莖基部,內部組織褐化腐爛(圖一 E、F),出現上述病徵之病害稱之為「基腐病」,而農友稱之為"死心"、"爛頭"或"敗叢"。褐化腐敗的情形常由母莖蔓延至側芽或分蘗,使幼芽無法生長而使植叢減小,嚴重時整叢植株死亡(圖一 D),常造成減產,甚至廢耕;若結筍株受感染,則所採收之筍體有褐化壞疽的條斑現象(圖一 G),且風味盡失,不具商品價值。

2001-2007 年於台灣茭白筍主要產區—南投縣、台北縣與宜蘭縣調查茭白基腐病之發生情況。在南投縣埔里鎮及魚池鄉於調查期間,每年夏季均發生此病害,埔里鎮當時茭白栽培約 1,400 公頃,產區較集中,其中約 900 公頃出現基腐病,以眉溪與南烘溪交會區域為多,溪流上游處的田地則較少或無病害發生;魚池鄉茭白田約 150 公頃,但產區相當分散,病害多發生於產區較聚集的共和村,約有 50 公頃發生基腐病;台北縣三芝鄉與宜蘭縣礁溪鄉僅栽培"赤殼"品種茭白合計約 100 公頃,經調查均未發現有基腐病的發生。



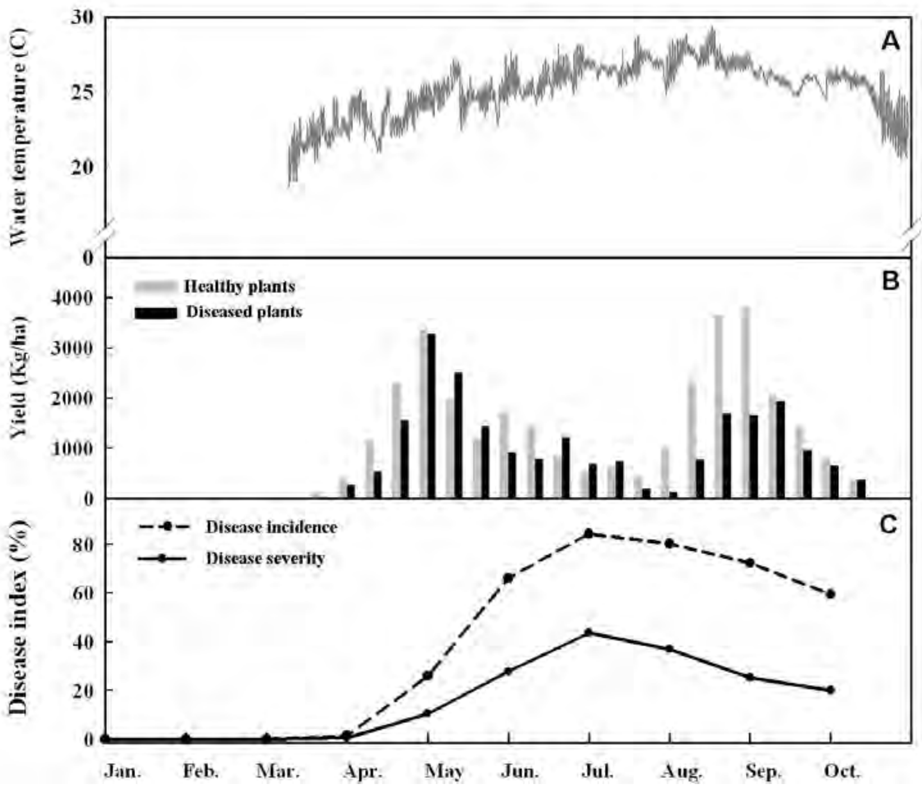
圖一、茭白基腐病之病徵。健康茭白植株（A），發生嚴重基腐病之茭白植株（B）；基腐病造成茭白新葉枯黃（黃色箭頭）（C），嚴重者全株枯死（D）。健康與病株莖基部縱剖圖（E）；茭白基腐病亦可蔓延至膨大可食用之筍體（紅色箭頭）（F、G）；病原菌易自採收之傷口侵入（白色箭頭）（H、I）。（紅色圓圈代表可分離得 *Pythiogeton zizaniae*，而綠色圓圈則否）

Fig. 1. The symptoms of basal stalk rot of water bamboo. The healthy (A) and disease plants (B) in the fields. New leaves yellowing due to stem rot (yellow arrow) (C), plant death (D), browning and rot of internal tissues (E). Rot of water bamboo galls (red arrows) (F, G). The pathogen infecting through harvest wounds (white arrows) (H, I). (Red cycles present the tissues positively detected with *P. zizaniae*, but green cycles not)

2001 年於埔里鎮選取發生或無發生基腐病之茭白栽培田各一塊，為同一農戶種植，相距約 500 公尺且灌溉水無相流通，茭白筍基腐病田間病害調查顯示（圖 二），3 月下旬開始少量採筍而此時水溫約為 20-23℃，病害於 4 月下旬開始輕微發生，水溫為 22-25℃。5 月為第一筍期的盛產期，病害也逐漸嚴重，7 月為病害的高峰，發病率 84.5% 而發病度為 43.8%，此時水溫為 25-29℃，爾後病害漸降低，於 10 月時的發病率及發病度分別為 59.5% 及 20.1 %。罹病田第一與第二期筍產量分別為11.2 及 11.8 公頓/公頃，而無罹病田則分別為 12.7 及 19.4 公頓/公頃。2004 年的病害調查結果顯示："早生青殼"品種發生基腐病以 7-8 月最嚴重，發病率及發病度最高分別可達 87.5% 及 32.2%，而 "赤殼"品種茭白基腐病病勢較輕，發病率及發病度最高分別為 20.2% 及 7.8%。

進一步檢測罹病株的病原菌感染率，將取樣檢測的茭白植株罹病程度區分為:（1）健株—植株新葉無失水或黃化徵狀且莖基內部無褐化腐敗;（2）初期病徵—植株新葉輕微褪色而莖基內部輕微褐化；（3）中期病徵—植株新葉失水輕微黃化而莖基內部褐化；（4）末期病徵—新葉甚至老葉枯黃而莖基內部褐化腐敗。並於觀察田間罹病初、中期的茭白植株在 14-21 天後會進一步出現末期病徵。於 2003-2005 年 6-7 月選取茭白無基腐病、初期、中期及末期病徵各 50 株，以添加鏈黴素、免賴得與撲克拉分別 800、1 與 1ppm 的改良式馬鈴薯葡萄糖瓊脂進行亞腐霉菌 *P. zizaniae* 分離，並利用核酸專一性引子對（Fc12-1/Rc12-2）經由聚合酶連鎖反應（Polymerase Chain Reaction，PCR）進行細菌 *E. cloacae* 之檢測（郭 2004），結果該 2 種病原菌在健株的檢出率分別為 0 及 24%、在初期病徵植株分別為 100% 及 16%、在中期病徵植株分別為 82% 及 58%、在末期病徵植株分別為 86% 及 90%（表一）。

由病原菌的檢測發現 *P. zizaniae* 在茭白基腐病佔重要的角色，且人為接種 *P. zizaniae* 與 *E. cloacae*，發現前者較能接種於茭白成株或幼苗產生與田間相同的莖基部腐敗的病徵（黃等 2001）；而後者可造成幼苗病害，但成株則不易產生與田間相同的莖基部腐敗的病徵（洪 2002，郭 2004）。本研究爾後試驗是針對由 *P. zizaniae* 引起之病害而進行。



圖二、 2001 年埔里茭白基腐病田之水溫測量（A）、病田與健田茭白筍產量（B）及病田基腐病（C）之調查。水溫偵測處為水面下 45 公分；發病率（disease incidence）：出現基腐病病徵植叢數佔所有調查植業之百分比率；發病度（disease severity，P）：將病害等級以調查植叢出現病徵的枝數佔該叢的比例多寡區分為 0-10 級，0 級為健全無基腐病病徵，1 級為發病分枝佔全株之 10%以下，2 級為發病分枝佔全株之 10-20%，以此類推至 9 級為發病分枝佔全株之 80-90%，而 10 級為發病分枝佔全株之 90%以上，並以下列公式計算 $P (\%) = (\Sigma n_i \times i)/(N \times 10) \times 100\%$；i= 各病害等級，$n_i$= 各病害等級之植株數，N=所有植株。

Fig 2. The fluctuation of water temperatures (A) yields (B), and disease index of water bamboo in disease field (C) at Puli, 2001. Water temperature was detected at the position 45 cm under water surface. Disease incidence was recorded by the percentage of disease plants. Disease severity was recorded on a scale of 0-10 rely on the ratio of diseased shoots of the whole plants. 0= no diseased shoot, 1= the ratio of disease shoots 1-10%, 2= the ratio of disease shoots 11-20%..., and 10= the ratio of disease shoots 91-100%. The ratings are converted to disease severity (P) by the following formula: $P (\%) = (\Sigma n_i \times i)/(N \times 10) \times 100\%$. Where n_i is the number of plants in each symptom category of i and N is the total number of plants rated.

表一、茭白基腐病病原菌 *Pythiogeton zizaniae* 與 *Enterobacter cloacae* 於病害初期、中期或末期罹病株莖基部之檢出率

Table 1. Detection of *Pythiogeton zizaniae* and *Enterobacter cloacae* from basal stalk tissues of water bamboo plants with different disease degrees of basal stalk rot.

	Percentage of detection (%) [Z]			
	Disease stages			
Microorganism	Healthy [Y]	Early	Middle	Late
P. zizaniae	0	100	82	86
E. cloacae	24	16	58	90

[Z] For *P. zizaniae*, isolation rate on agar medium; for *E. cloacae*, detection rate by PCR with the specific DNA primer (Fc12-1/Rc12-2).

[Y] Disease stages, Healthy: no symptoms; Early: mild wilt symptom on new leaves and light browning in basal stalk tissues; Middle: wilt symptom on new leaves and browning in basal stalk; Severe: yellowing symptom on leaves and dark browning in basal stalk.

灌溉水與採筍傷口對茭白基腐病之影響

取回埔里田間的茭白苗，無論茭白種苗來自上季發生過或以前未曾發生茭白基腐病之田區，於種莖內部及分蘗苗莖基部組織均未能分離基腐病菌*P. zizaniae*，將種苗種植於盛有新植地土壤與地下水的塑膠桶內，則皆不會發病；田間試驗發現，若種植於埔里鎮曾發生茭白基腐病的連作田或不曾發生基腐病的新植地，只要灌溉水相通，皆會發生嚴重的基腐病，發病率 79.4-94.5%，發病度 21.3-27.3%。

此外在埔里田間選取側芽有或無基腐病徵的茭白莖段各 100 個，該些茭白莖段帶有採筍的傷口及 3-4 個莖節（圖一H、I），進行基腐病菌*P. zizaniae*分離，在側芽有基腐病徵之茭白莖段，基腐病菌 *P. zizaniae*之分離率為 96%，從傷口處、第 1、2 及 3 節之分離率分別為 72、78、50 及35%；而側芽無基腐病徵之茭白莖段，基腐病菌*P. zizaniae*之分離率為10%，從傷口處、第 1、2 及 3 節之分離率分別為 8、4、0及 0%（表二）。此外，所選取 2,000 個根帶的茭白莖部組織，其中 25 個出現褐化壞疽的現象，

但分離到基腐病菌 *P. zizaniae* 僅有 3 個，而其餘 1,775 個無褐化壞疽者皆無法分離得。

上述結果顯示灌溉水為病原菌主要傳播途徑，而採筍的傷口為病原菌主要感染處，病原菌侵入後可蔓延至側芽。

表二、茭白莖部採收傷口及莖節之基腐病菌 *Pythiogeton zizaniae* 分離率。
Table 2. Isolation of *Pythiogeton zizaniae* from different portions of stem tissues of water bamboo.

Stem [Z]	Isolation rate (%) of different distance portions from the wound part [Y]			
	Wound parts	1st node	2nd node	3rd node
Symptomless	8	4	0	0
Diseased	72	78	50	35

[Z] The tillers of stems showed symptomless or leaf yellowing symptom.
[Y] 1, 2, and 3: the number of nodes on stem serially counting from the wound parts.

利用田間排水與產期調控以管理茭白基腐病

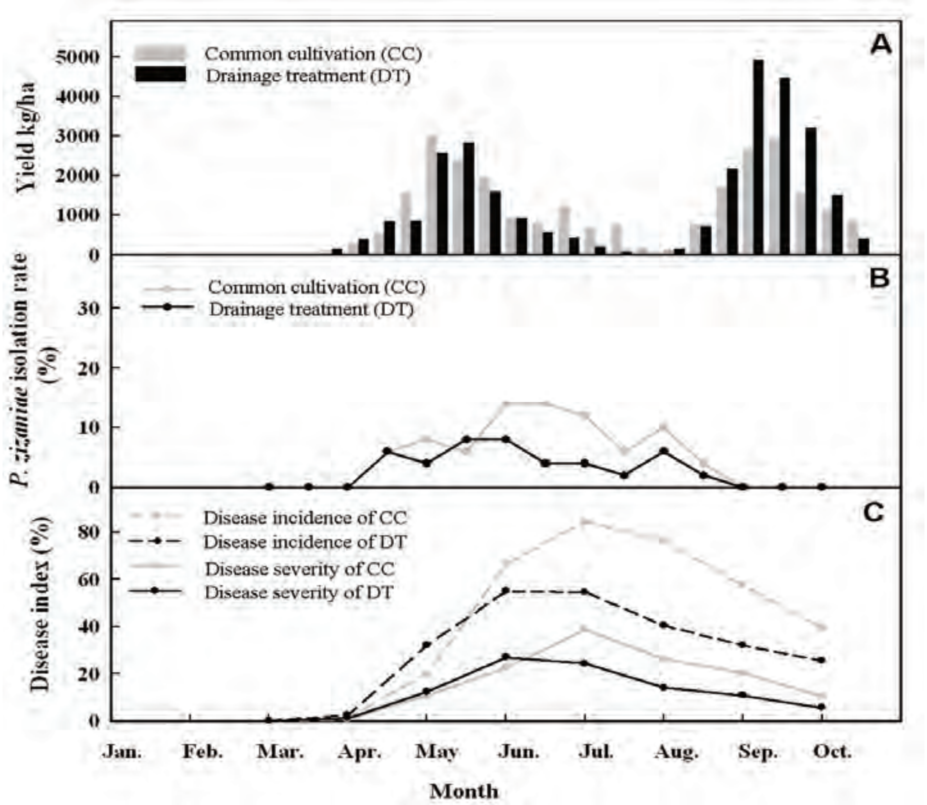
於埔里鎮茭白基腐病疫區設立試驗田 6 塊，測試不採筍或採筍排水對基腐病的影響。結果在第一期筍採收時全期排水（75 天）或完全不採收第一期筍，可延緩並降低基腐病的發生，於 6 月割除腐敗的筍體與枝葉並恢復灌溉水後，對照組、第一期筍採收期排水之處理組與第一期筍不採收的處理組，於 7 月病害高峰期之發病率分別為 84.5%、26.0% 與 18.0%，發病度分別為 29.2%、6.0%與 3.9%，後 2 個處理組均與對照組有顯著差異。

進一步設立 2 塊試驗田，將排水期間縮短為 40 天，僅於第一筍期中末期（5-6 月）基腐病開始發生時排水，以慣行栽培不排水為對照組，記錄排水對茭白基腐病之影響。由圖三結果顯示，排水處理組在 7 月的發病率及發病度分別為 54.5% 及 24.3%，而對照組之發病率及發病度分別為

84.5% 及 38.8%。排水處理組與對照組在 4 月下旬均可在母莖採筍傷口附近的組織分離得基腐病菌 *P. zizaniae*，分離率皆為 6%，而該病原菌於對照組在 6 月下旬分離率最高為 14%，然而排水處理組僅為 4%，2 個試驗組在 9 月後就無法分離得該菌。排水處理組之第一期筍之產量為 11.1 公噸/公頃，較對照組 12.8 公噸/公頃低，但第二期筍之產量為 17.8 公噸/公頃，較對照組 13.4 公噸/公頃高。

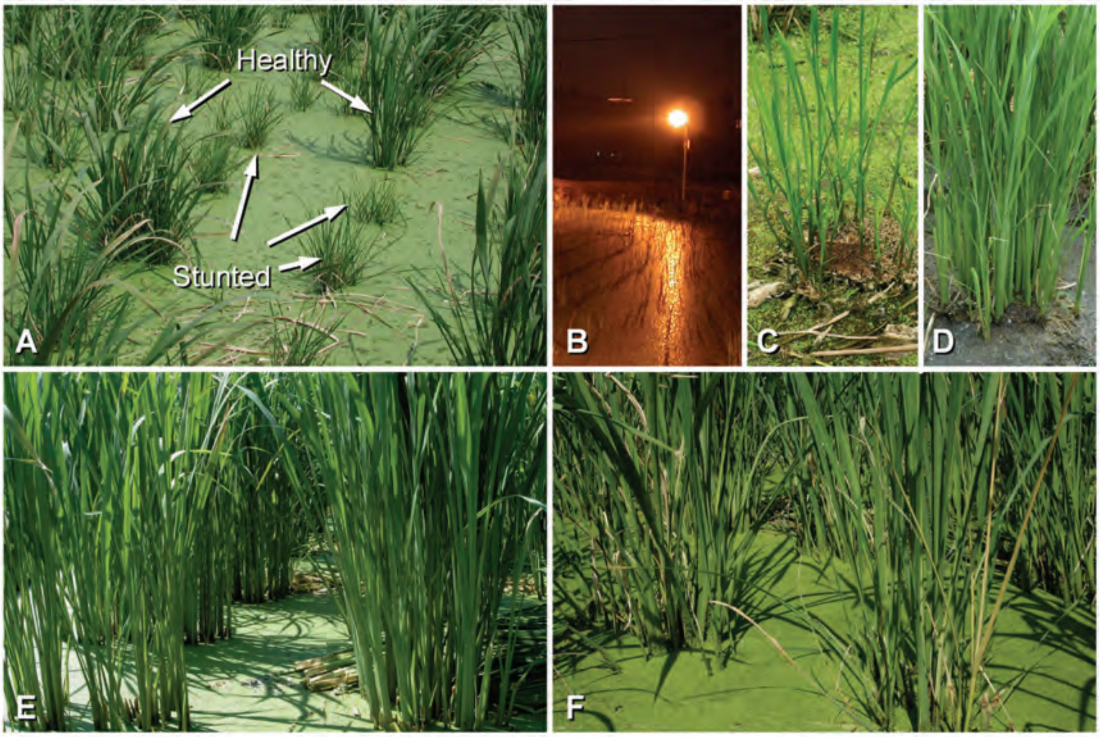
由於第一筍期全期排水再採筍對茭白筍的產量與品質影響甚巨，雖然縮短於第一筍期中末期（5-6 月）基腐病開始發生時排水，仍會使第一期筍產量降低，故提早於 11 月育苗，期能提早採筍以避免排水對第一期筍產量的影響。然而提早種植會發生一種暫稱為「矮化症」的新病害，植株出現矮化無法正常生長（圖四 A）（廖等 2002），雖然目前病因尚未明瞭，但分蘗生長期間實施夜間照光（圖四 B）則可避免此「矮化症」的發生。

由圖五顯示 2005-2006 年田間試驗，處理組提早 1 個月於 11 月開始育苗種植，每公頃裝設 15-20 盞 400 瓦鹵素燈，自育苗時至分蘗生長期（2 月上旬）夜間照光 100 天，每晚照光 6-10 小時，此種管理方式可使第一期筍於 3 月下旬至 4 月採收，較慣行栽培之第一筍期（4-6 月）提早約 1 個月採收完畢，產量並未減少。提早採收後隨即排水，以減少基腐病的發生並維持茭白筍的產量，排水處理田的發病率及發病度最高分別為 45.0% 及 8.5%，較對照田的發病率 68.5% 及發病度 20.0% 低；排水處理組之第一與第二期筍之產量分別為 12.2 與 22.4 公噸/公頃，而對照組則分別為 9.5 與 20.9 公噸/公頃高。



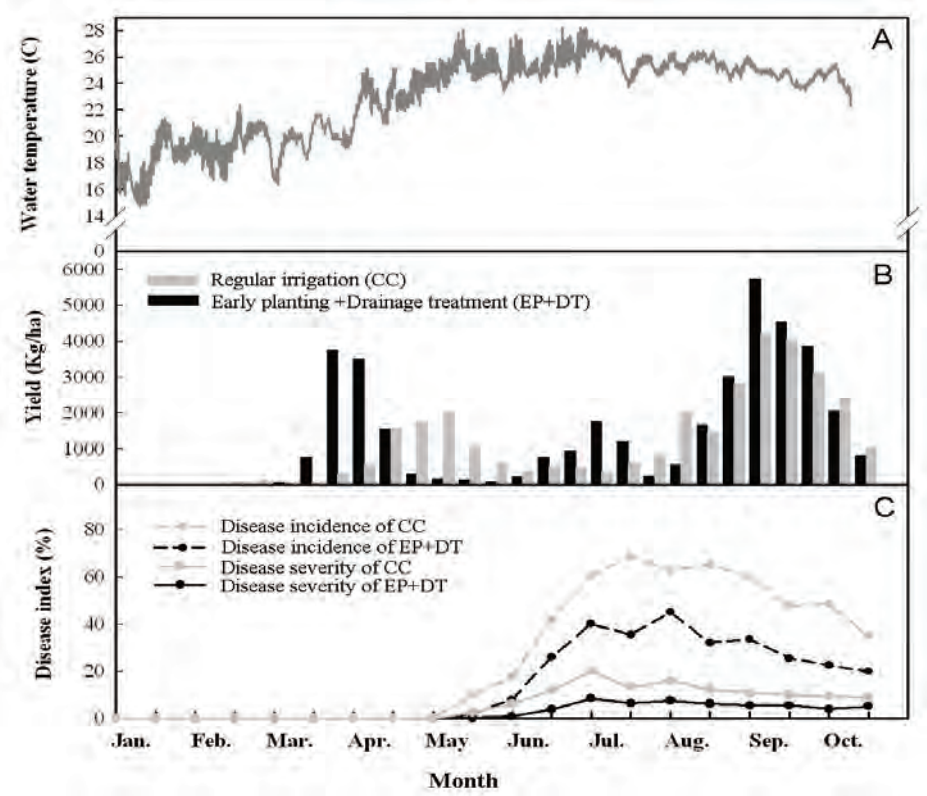
圖三、排水對茭白筍產量（A）、茭白採收傷口病原菌 *Pythiogeton zizaniae* 分離率（B）、與茭白基腐病（C）及之影響。慣行農法為全期不排水栽培（CC）；而排水處理組（DT）於 2003 年 5 月 15 日至 6 月 15 日（第一期筍末期）為排水期，爾後則恢復正常浸水栽培之水位。發病率（disease incidence）：出現基腐病病徵植叢數佔所有調查植業之百分比率；發病度（disease severity，P）：將病害等級以調查植叢出現病徵的枝數佔該叢的比例多寡區分為 0-10 級，0 級為健全無基腐病病徵，1 級為發病分枝佔全株之 10%以下，2 級為發病分枝佔全株之 10-20%，以此類推至 10 級為發病分枝佔全株之 90-100%以上，並以下列公式計算 P (%) = $(\Sigma n_i \times i)/(N \times 10) \times 100\%$；i= 各病害等級，$n_i$= 各病害等級之植株數，N=所有植株。

Fig. 3. Effect of drainage on water shoot yield (A), pathogen isolation rate (B), and basal stalk rot disease (C) of water bamboo in 2003. Common cultivation (CC): non-drainage in the whole cultivation season; Drainage treatment (DT): draining from May 15 to June 15. Disease incidence was recorded by the percentage of disease plants. Disease severity was recorded on a scale of 0-10 rely on the ratio of diseased shoots of the whole plants. 0= no diseased shoot, 1= the ratio of disease shoots 1-10%, 2= the ratio of disease shoots 11-20%..., and 10= the ratio of disease shoots 91-100%. The ratings are converted to disease severity (P) by the following formula: P (%) = $(\Sigma n_i \times i)/(N \times 10) \times 100\%$. Where n_i is the number of plants in each symptom category of i and N is the total number of plants rated.



圖四、田間排水與產期調控以管理茭白基腐病。茭白提早種植易發生矮化症（A）；分蘖生長期配合夜間照光（B）；採收後排水並去除枝葉使分蘖同期長出（C、D），可減少基腐病的發生（E）。慣行浸水栽培常發生基腐病（F）。

Fig. 4. Drainage and harvest season regulation for management of basal stalk rot of water bamboo. The stunted plants of water bamboo due to earlier planting in November (A), night lighting treatment (B). Drainage after harvest and shoots cut off (C, D) effectively decrease the basal stalk rot disease of water bamboo (E) comparing to the common cultivation process which were irrigated in all season (F).



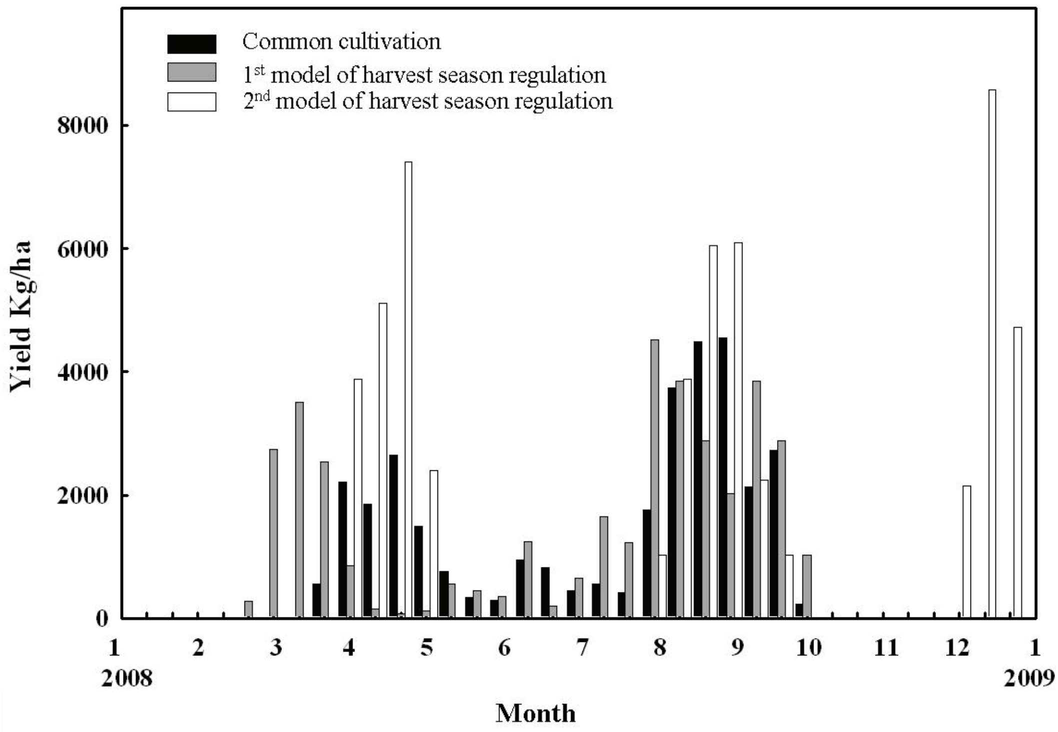
圖五、提早種植並排水對茭白筍產量(B)及基腐病(C)之影響。圖 A 為 2005 年埔里茭白慣行栽培田之水溫測量。提早種植並排水處理組(EP+DT)及慣行不排水栽培組(CC)開始育苗栽培日期分別 200 年 11 月 1 日 12 月 1 日，處理組(P+DT)進行夜間光照，光照期間為種植日起至 2005 年 2 月 10 日止共 100 日，4 月 20 日至 5 月 31 日為排水期 40 天，慣行栽培則無光照亦無排水。發病率(isease incidence)出現基腐病病徵植叢數佔所有調查植業之百分比率；發病度(isease severity，P)將病害等級以調查植叢出現病徵的枝數佔該叢的比例多寡區分為 0-10 級，0 級為健全無基腐病病徵，1 級為發病分枝佔全株之 10%以下，2 級為發病分枝佔全株之 10-20%，以此類推至 10 級為發病分枝佔全株之 90-100%以上，並以下列公式計算 $P (\%) = (\Sigma n_i \times i)/(N \times 10) \times 100\%$；i= 各病害等級，$n_i$= 各病害等級之植株數，N=所有植株。

Fig. 5. Effect of earlier planting plus drainage after first harvest season on basal stalk rot (C) and yield (B) of water bamboo in 2005. The water temperatures of a common cultivation field were measured (A). Common cultivation (CC): seedlings were planted in Dec. 1, 2005, without night lighting and drainage. Earlier planting +drainage treatment (EP+DT): seedlings were planted in Nov. 1, 2004 with night lighting for 100 days, and drained from Apr. 20 to May 31. Disease incidence was recorded by the percentage of disease plants. Disease severity was recorded on a scale of 0-10 rely on the ratio of diseased shoots of the whole plants. 0= no diseased shoot, 1= the ratio of disease shoots 1-10%, 2= the ratio of disease shoots 11-20%..., and 10= the ratio of disease shoots 91-100%. The ratings are converted to disease severity (P) by the following formula: $P (\%) = (\Sigma n_i \times i)/(N \times 10) \times 100\%$. Where n_i is the number of plants in each symptom category of i and N is the total number of plants rated.

採收後排水並割除所有枝葉以管理茭白基腐病

由前述提早種植茭白加上夜間照光可提早採收第一期筍，隨後實施排水的期間，割除地上部所有枝葉讓分蘗重新長出（圖四C、D），可大幅減少茭白基腐病（圖四E、F）。由表三所示，利用提早種植並夜間照光之處理於 4 月採筍完畢，試驗田於 5 月進行 3 種處理，分別為：5 月 1 日至 6 月 1 日排水（處理組A）、同處理 A 排水並割除地上部所有枝葉使分蘗重新長出（處理組B）與全期不排水且不割除所有枝葉之對照處理（CK）。在 7 月病害嚴重時，發病率及發病度在處理組 A 分別為 10.3% 及 0.4%，在處理組 B 分別為 47.3% 及 9.1% ，而在對照組分別為 65.0% 及 13.2%，無論發病率或發病度，3 個試驗組之間均差異顯著。第一期筍的產量在 3 個試驗組間無差異，而第二筍期的產量在處理組 A 為 22.2 公噸/公頃，與處理組 B 之 22.4 公噸/公頃無顯著差異，但 2 個處理組皆與對照組之 20.5 公噸/公頃有顯著差異。

在茭白筍採收後排水並割除地上部枝葉，則可同步長出大量的分蘗苗，可使茭白筍產期集中，此特性造成採收期可由以往採收 1 個筍期自 2.5 個月縮短為 1-1.5 個月，1 年便可獲得 3 個筍期。由 2008-2009 年的田間試驗結果顯示（圖六），慣行栽培期為 12 月至翌年 10 月，而第一與第二筍期之產量分別為 11.6 及 21. 1 公噸/公頃，提早 1 個月種植且於分蘗生長期需輔以夜間照光，則可使第一筍期自原本 4-6 月提早至 3-4 月，於 5 月排水 30 天，第一與第二筍期之產量分別為 12.1 及 23.5 公噸/公頃。而一年 3 個筍期的栽培法，每個筍期前皆排水並割除地上部枝葉（從 2007 年第 3 期筍結束，於 2008 年 1 月進行處理），2008 年 3 個筍期的產量分別為 17.8、20.3 及 16.1 公噸/公頃。



圖六、種茭白筍栽培生產方法之產期與產量比較。慣行栽培法（Common cultivation）為全期不排水栽培；第 1 種產期調控（1st model of harvest season regulation）為提早 1 個月育苗種植並於苗期輔以夜間光照 100 天；第 2 種產期調控（2nd model of harvest season regulation）為每一筍期結束後排水並割除地上部枝葉使分蘗同期長出。

Fig. 6. Comparison of 3 cultivation models for production of water bamboo. Common cultivation: cultivation periods was from Dec. to Oct. of the next year with irrigation for the whole periods; 1st model for regulation of harvest season: planting 1 month earlier with night lighting for 100 days; 2nd model for regulation of harvest season: after harvest of bamboo shoot in each season, fields were drained and the all plants above ground were cut off to assist tillers growth simultaneously.

表三、期筍採收後排水與排水並割除枝葉對茭白基腐病之影響.

Table 3. Effect of the method treated with drainage and cut off the shoots after the first harvest season on the basal stalk rot of water bamboo.

Treatment [Z]	Disease incidence % (Dis. severity %) [Y]				Yield (t/ha)	
	May		July		1st season	2nd season
CK	10.3 a [X]	(1.5 a)	65.0 a	(13.2 a)	11.7 a	20.5 b
A	7.7 a	(0.9 a)	47.3 b	(9.1 b)	10.5 a	22.4 a
B	8.7 a	(1.1 a)	10.3 c	(0.4 c)	11.2 a	22.2 a

[Z] ll seedlings were planting in November 1st. CK: No drainage; A: drainage from May 1 to June 1, but without shoot cut off; B: drainage plus cut off all the shoots.

[Y] isease incidence was recorded by the percentage of disease plants. Disease severity was recorded on a scale of 0-10 rely on the ratio of diseased shoots of the whole plants. 0= no diseased shoot, 1= the ratio of disease shoots 1-10%, 2= the ratio of disease shoots 11-20%..., and 10= the ratio of disease shoots 91-100%. The ratings are converted to disease severity (P) by the following formula: $P (\%) = (\Sigma ni \times i)/(N \times 10) \times 100\%$. Where ni is the number of plants in each symptom category of i and N is the total number of plants rated.

[X] eans followed by the same letters within each column are not significantly different at p=0.05 according to the LSD Test.

討　論

因茭白基腐病病原菌 *P. zizaniae* 主要藉由灌溉水傳播，並易自採筍傷口侵入，而南投縣埔里鎮茭白筍田的灌溉水常與相鄰的田區相互流通，一發生病害則蔓延甚速，短短數年即有大量茭白筍栽培田出現此病害，估計最多約達 1,000 公頃。此病害於第一筍期中末期開始發生，但對該筍期影響較小，7 月為病害最嚴重時期造成分蘖數減少，而嚴重影響第二筍期的產量。第一筍期中末期排水 30-40 天可降低基腐病於 7 月的發病，但排水期間使第一期筍的產量有損失，提早種植可提早採收，則可避免排水期影響產量與品質，然而提早種植會發生一種植株出現矮化無法正常生長的問題，稱之為「矮化症」(廖等 2002)，但分蘖生長期間實施夜間照光則可避免此問題。

因茭白第一期筍採收的傷口就有部分被基腐病菌 *P. zizaniae* 感染（圖一H、圖一I、圖三、表二），即使爾後排水減少感染的機會，但原先感染莖部的病原菌會蔓延至側芽或分蘖苗，基腐病仍會於第二期筍出現，若於第一期筍採收後排水（提早或不提早採收），並將地上部枝葉（包括感染或未感染基腐病）全部割除，讓分蘖苗重新長出 1-1.5 個月後再恢復灌溉水位，由於莖基部無採收傷口，即使浸水也不會出現病原菌感染而造成病害，可大幅減少基腐病的發生（表三）。然而此方式為不同的栽培管理，產量並無增加，不過茭白筍採收期可縮短為 1-1.5 個月。

由茭白基腐病的防治過程中，衍生出 2 種茭白筍產期調控的方式：第一種產期調控利用提前種植加上冬季夜間照光可使第一筍期提早採收；而第二種為割除枝葉使分蘖苗集中於同一時期生長。因為後者可將茭白筍產期調控為 1 年 3 個筍期（圖六），打破以往的觀念，認為早生青殼種一年僅有 2 個筍期，而茭白筍的品種常以一年單季或雙季產筍來分辨，這些觀念均因新的栽培法而須改變。觀察記錄 “早生青殼”品種茭白慣行栽培，顯示無論第一或第二期筍，茭白筍孕筍的最適水溫為 20-25℃（圖二），與學者的報告相同（林與洪 2000，林 2005），然而經由提早種植與分蘖期夜間照光，經停止光照後約 45 天，則於水溫約 17-20℃的 3-4 月即可孕筍採收（圖五），顯示影響茭白孕筍的條件應不僅水溫。此現象目前僅知在早生青殼品種會發生，至於茭白筍的結筍條件，則待進一步研究茭白植株、茭白黑穗菌及氣侯因子三者之間的相互關係。

總之，埔里鎮的茭白基腐病主要以排水管理來減少病害發生，目前大面積實施夜間照光主要目的為避免「矮化症」，夜間照光並未能防治基腐病，唯有排水（病害初期 5-6 月）才有防治病害的效果。

引用文獻

林天枝. 2005. 茭白筍. 臺灣農家要覽 農作篇(二). 財團法人豐年社出版. 臺灣 臺北. p271-276.

林天枝、洪滋堂. 2000. 茭白筍早生新品種—台中一號之育成. 台中區農改

場研究彙報 66:37-56.

洪明偉. 2002. 茭白細菌性基腐病菌之鑑定與偵測. 國立中興大學植物病理學研究所碩士論文. 71 頁.

郭建志. 2004. 茭白細菌性基腐病菌 *Enterobacter cloacae* 檢測技術之研發與應用. 國立中興大學植物病理學研究所碩士論文. 71 頁.

黃晉興、安寶貞、柯文雄. 2001. 茭白基腐病病害生態之初步探討. 植病會刊 10：202.

楊秀珠. 1976. 茭白筍之儲藏，組織解剖及其病原菌. 國立中興大學植物病理學研究所碩士論文. 72 pp.

廖君達、林金樹、陳慶忠. 2002. 臺灣茭白筍病蟲害種類及發生消長調查. 臺中區農業改良場研究彙報 75:59-72.

劉顯達、郭孟祥. 1976. 茭白黑穗病之研究 I 茭白黑穗病病組織之解剖及病菌發芽培養特性. 屏東農專學報 17:188-194.

鍾光仁. 1989. 茭白筍黑穗病菌營養需求、培養特性及 IAA 合成之研究. 國立中興大學植物病理學研究所碩士論文. 80 pp.

Ann, P. J., Huang, J. H., Wang, I. T., and W. H. Ko. 2006. *Pythiogeton zizaniae*, a new species causing basal stalk rot of water bamboo in Taiwan. Mycologia 98: 116-120.

Chan, Y. S., and Thrower, L. B. 1980. The host-parasite relationship between *Zizania caduciflora* Turcz. And *Ustilago esculenta* P. Henn. Ⅰ. Structure and development of the host and post-parasite combination. New Phytol. 85:201-207.

Terrell. E. E., and Batra, L. R. 1982. *Zizania latifolia* and *Ustilago esculenta*, a grass-fungus association. Economic Botany 36:274-285.

Thrower, L. B., and Chan, Y. S. 1980. Gau sun: a cultivated hpst-parasite combination from China. Economic Botany 34(1):20-26.

Yang, H. C., and Leu, L. S. 1978. Formation and histopathology of galls induced by *Ustilago esculenta* in *Zizania latifolia*. Phytopathology 68:1572-1576.

ABSTRACT

Utilizing harvest season regulation and field drainage for the management of basal stalk rot of water bamboo

Huang Jin-Hsing[1,3], Lin Yi-Hseng[2], Ann Pao-Jen[1],

[1] Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, COA. Wufeng, Taichung, Taiwan.

[2] Department of Biotechnology, Asia University, Taichung, Taiwan.

[3] Corresponding author, Email: JHHuang@tari.gov.tw

Basal stalk rot (or basal stem rot) caused by *Pythiogeton zizaniae* and/or *Enterobacter cloacae* was a serious disease of water bamboo (*Zizania latifolia* (Griseb.) Turcz. ex Stapf.), which occurred in summer and caused considerately economic loss each year in Nantou county since 1999. The results of field investigation showed that the major local cultivar ‘Green Shell Early’ of water bamboo was very susceptible with disease severity as high as 43.8% in July. The regular plantation periods of time, including two harvest seasons, were about ten months from December to October of the next year. The first harvest season (1st season) is form April to June and the second (2nd season) from July to October. The basal stalk rot disease was more advanced in the 2nd season. Results of studies showed that the disease in the 2nd season significantly decrease in the treatments without harvesting in the 1st season or with drainage for 30-40 days at the late period of the 1st season. In order to avoid the yield loss in the 1st season caused by drainage, the technique that early planting (in November.) plus night lighting treatment during the seedlings stage (from November through February) was developed for harvest season regulation. This treatment could promote the 1st harvest season (March to April) about 1 month earlier, which would make up the yield loss due to drainage in the 1st season. Furthermore, the method treated with drainage and cut-off all the above ground plants post the 1st season would assist new tillers growth and significantly reduce basal stalk rot disease. The disease severity of treatment using this method was only 0.4%, which was significantly lower than those of merely drainage treatment (9.1%) or non-drainage (13.2%).

Key words： water bamboo, *Ziania latifolia*, basal stalk rot, *Pythiogeton* spp., drainage, stunting syndrome

近年來我國重大疫病之研究

安寶貞[1,3]、劉瑞芬[2]、蔡志濃[1]

[1] 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組

[2] 國立台灣大學植物病理與微生物學系

[3] 聯絡作者，電子郵件信箱：pjann@tari.gov.tw

摘　要

疫病菌 (*Phytophthora* deBary) 為植物強敵，目前發表之有效種 (species) 約有百餘種，存在台灣的約有 30 種，近年在台灣造成重大疫情者包括 (1) *Phytophthora infestans* US11 菌系釀成之馬鈴薯與番茄晚疫病；(2) *P. citrophthora* 新菌系引起之金柑疫病；及 (3) *P. capsici* 同絲配對型 (具 A^2 配對型之傾向) 崛起，造成之茄科與瓜類疫病。茲說明如下：(1) 台灣自 1997 年 12 月在台中后里地區爆發嚴重之馬鈴薯與番茄晚疫病後，兩個月內病害遍及全台，並導致馬鈴薯栽培區南移至斗南地區，目前已經證實病害發生係因強毒性菌株 US11 入侵之結果，該菌系為 A^1 配對型、致病性強、生長快速 (於最適溫 20℃時，新菌系直線生長速率平均為 5.15 mm、舊菌系為 2.68 mm)、耐高溫 (新菌系最高生長溫度 27-29℃、舊菌系 24-25℃)、及抗多種化學農藥 (滅達樂【metalaxyl】對新菌系菌絲生長抑制濃度(LD50)為 200-400 ppm、舊菌系為 0.005-0.001 ppm，抗藥性提高 4-40 萬倍)。(2) 宜蘭地區之金柑，於 1995-1997 年，爆發植株大量急速萎凋與死亡現象，伴隨嚴重之枝枯、流膠、落葉與落果，受害地區高達 80%以上。分離到相關性最高的病原菌為柑橘疫病菌 (*P. citrophthora*)，但為害金柑之菌系與一般為害柑橘屬的 *P. citrophthora* 菌系有很大差異。在寄主專一性方面，金柑屬疫病菌系不會造成柑橘屬植株死亡，反之亦然；此外，兩者之菌落型態不同，菌絲蛋白電泳圖譜略異，核醣體內轉錄區間 ITS (ITS1-5.8S rDNA-ITS2) 的基因序列亦略異。金柑菌系的 ITS 序列長度均為 779 bp，且全部序列相同；

β 微管蛋白(β-tubulin) 的部份 DNA 序列(長度 651 bp)亦完全相同，所有菌株似源自單一菌株；柑橘屬菌系 ITS 全長為 782、783 或 784 bp，與柑橘菌系相比，所有金柑菌系在 ITS1 區域有 4 處鹼基對缺遺與 2 處鹼基置換，而在 ITS2 區有 6 處鹼基置換。顯示台灣之金柑疫病非由本土柑橘屬菌系引起。(3) 番椒疫病菌 (*P. capsici*) 在台灣的記錄一直為 A^{1}配對型，直到 2007 年 4 月首度發現同絲型出現，目前 (2010 年) 同絲型已遍佈全台，僅高山地區尚可分離到 A^1 型。與 A^1 菌系比較，同絲型新菌系除會形成卵胞子外，其胞囊較狹長且脫落率較高、產胞較嗜高溫 (同絲型產胞最適溫為 28-32℃，A^1 菌系大部分為 24℃)、且毒性較強。比較分析同絲型番椒疫病菌系間之親緣關係，ITS 序列全長均為 753 bp，有 6 處相異，可以分為 3 群；β 微管蛋白(β-tubulin) 的部份 DNA 序列(長度 651 bp)，亦有 8 處相異，可以分為 9 群。從以上特性尚無法判斷台灣 A^2 菌株崛起之原因。

關鍵詞： 重大疫病，晚疫病、金柑疫病、番椒疫病、*Phytophthora infestans* US11, *P. citrophthora* 金柑菌系, *P. capsici* 同絲型

緒　言

疫病菌 (*Phytophthora* deBary) 為世界上最重要之植物病原菌之一，危害作物千種 (species) 以上，在國際上曾釀成重大疫情，對經濟、景觀及生態都造成莫大的影響[16]。該菌之現代分類屬於藻菌界 (Stramenopila)、卵球菌門 (Oomycota)、卵球菌綱 (Oomycetes)、露菌目 (Peronosporales)、腐霉菌科 (Pythiaceae)、疫病菌屬。目前世界上已發現且可被接受之有效種 (species) 約有 116 種[19, 安等未發表資料]，其中在 2000 年之前命名的有 55 種，在本世紀 (至 2010 年 9 月止) 才被發現的有 61 種，速度相當驚人，存在台灣的疫病菌約有 30 種 (表一)[23, 安等未發表資料]。

表一、台灣疫病菌的種類與發現年代

Table 1. List of *Phytophthora* species found in Taiwan

Species	Recorded year	Hosts
1. P. amaranthi	2007	莧菜
2. P. arecae (Coleman) Pethybridge	1995	檳榔
3. P. boehmeriae Sawada	1927	a
4. P. cactorum (Lebert & Cohn) Schroeder	1927	草莓、一葉蘭
5. P. capsici Leonian	1977	茄科、瓜類、枸醬、花卉
6. P. cinnamomi Rands	1965	酪梨、鳳梨、杜鵑、蘇鐵、苗木
7. P. citricola Sawada	1927	柑橘
8. P. citrophthora (R.E. Smith & E.H.smith) Leonian	1915	柑橘、金柑、番荔枝、桃、花卉
9. P. cambivora	2004	山櫻花
10. P. colocasiae Raciborski	1911	芋
11. P. cryptogea Pethybridge & Lafferty	1978	非洲菊、菊科、中草藥
12. P. cyperi (Ideta) Ito	1908	a
13. P. drechsleri Thompaon	1977	b
14. P. heveae Thompson	1980	a
15. P. humicola Ko & Ann	1985	a
16. P. infestans (Montagne) de Bary	1908	番茄、馬鈴薯
17. P. insolita Ann & Ko	1979	a
18. P. katsurae Ko & Chang	1979	a
19. P. lateralis (Tucker & Milbrath)	2009	林木
20. P. leersiae Sawada	1919	a
21. P. lepironae Sawada	1941	a
22. P. macrospora (Saccardo) Ito &Tanaka	1927	a

Species	Recorded year	Hosts
23. P. melonis Katsura	1979	瓜類
24. P. multivesiculata Ilieva, Man in ’t Veld, Veenbaas-Rijks & Pieters	1997	虎頭蘭
25. P. meadii McRae	1997	海芋、鶯歌桃
26. P. nicotianae Breda de Haan (*P. parasitica* Dasturr)	1942	柑橘、鳳梨、百香果、煙草、茄、花卉
27. P. palmivora (E. Butler) E. Butler	1974	柑橘、木瓜、蓮霧、印度棗、花卉
28. P. tropicalis Aragaki & Uchida	2003	觀賞植物
29. P. vignae Purss	1977	豇豆、豌豆
30. P. cactorum x P. parasitica	1995	枇杷、草莓

a. 腐生或在台灣為非重要病原菌。
b. 是否存在台灣尚未確定。

由於台灣高溫多濕，有利於疫病胞囊與游走子之形成與傳播，且冬季又缺乏低溫來降低土壤中之病原菌的密度，因此新疫病菌一旦入侵常導致重大的經濟損失。近 20 年來我國由疫病菌新菌系(含新種) 造成之重大疫病(為害面積在 20%以上)，依發生年代先後，包括：(1) 金柑疫病 (1995)，由 *P. citrophthora* 金柑菌系引起[3; 12]；(2) 馬鈴薯與番茄晚疫病 (1997)，由 *P. infestans* US11 菌系引起[24]；(3) 莧菜疫病 (2007)，由 *P. amaranthi* 引起[2]；及 (4) 茄科與瓜類疫病 (2007)，由同絲型 *P. capsici* 引起等[1,4]。本文在此簡介馬鈴薯與番茄晚疫病、金柑疫病及茄科與瓜類疫病等三種病害之發生與診斷鑑定。

馬鈴薯與番茄晚疫病

國外病害發生簡介

據推論，馬鈴薯晚疫病之發源地為墨西哥中部[18]，於 1843 年經由美國北部東海岸傳播至北歐，而於 1845-46 爆發世紀著名之馬鈴薯晚疫病，幾乎

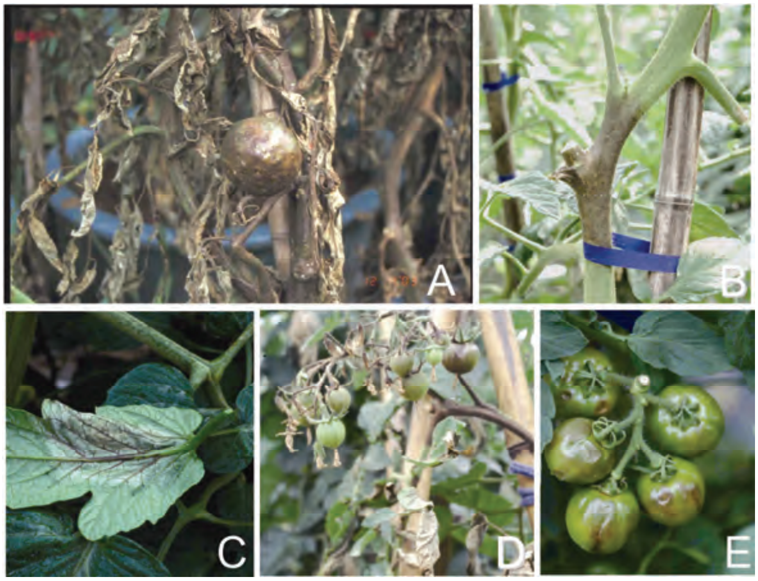
摧毀了整個歐洲的馬鈴薯產業，造成 18 世紀恐怖大飢荒，且導致百萬人口的遷徙[15]。一個半世紀後 (1980 年以後)，病害捲土重來，在世界各馬鈴薯與番茄產區氾濫成災，造成嚴重疫情，研究結果顯示主要是因晚疫病菌 (*Phytophthora infestans* deBary) A^2 配對型 (mating type) 與同絲型 (homothallic) 菌系 (strain) 崛起之故[17]。在 1980 年代之前，從歐洲與美加等地區收集到之晚疫病菌菌株大都屬於 A^1 配對型；然而 1984 年以後，歐美各國陸續出現 A^2 配對型或同絲型的菌株，而且強抗滅達樂農藥，導致疫情嚴重。世界各先進國家對晚疫病之族群分佈與變異情形十分關注，陸續開發出多種分子標記，包括同種異型酶譜 (allozyme patterns of glucose-6-phosphate isomerase-Gpi, malic enzyme-Me, and peptidase-Pep)[27]、粒線體 DNA 限制片段長度多型性 (mitochondrial restriction fragment length polymorphism)[21] 及 DNA 指紋分析 (DNA fingerprint analysis) 等。DNA 指紋分析所使用之核酸探針是 Goodwin *et al*.[20]等人自晚疫病菌基因庫篩選出來的一段 DNA，能夠辨識至少 25 個之基因座 (genetic loci)。研究顯示，根據上述分子標記之呈現情形，可將世界各地收集之晚疫病菌菌株區分為多個基因型 (genotype)，也可以用來追蹤菌系的流向與親緣關係。

晚疫病菌之特性與病害史

晚疫病的主要寄主為馬鈴薯與番茄，病菌可為害寄主全株 (圖一 & 二)。在馬鈴薯上，造成葉枯、莖腐及薯塊腐敗，嚴重時如火燒狀；侵染番茄時，引起花器枯萎、果實腐敗、葉枯及莖腐 (黑骨病)。本病為空氣傳播性病害，病菌的主要傳播器官與侵染器官為胞囊與游走子，可經由空氣流動、風雨吹彈飛濺或人畜攜帶，於短期內傳播至鄰近地區；而帶菌種薯或種子則可經由運輸作業而傳播至非常遙遠的地區。又，本病在種薯運輸途中或儲藏期間，均可由病薯傳至健康種薯。該病菌喜冷涼潮濕環境，低溫高濕 (18-20℃，相對濕度 90%以上時) 之環境最適合發病；而陰冷降雨時病勢進展極為迅速，發病最為嚴重，如果栽培為感病品種又無事先防範，全園植株在得病後兩週內即可能會全部焦枯死亡，而且會波及相鄰與附近薯田。

圖一、馬鈴薯晚疫病之病徵

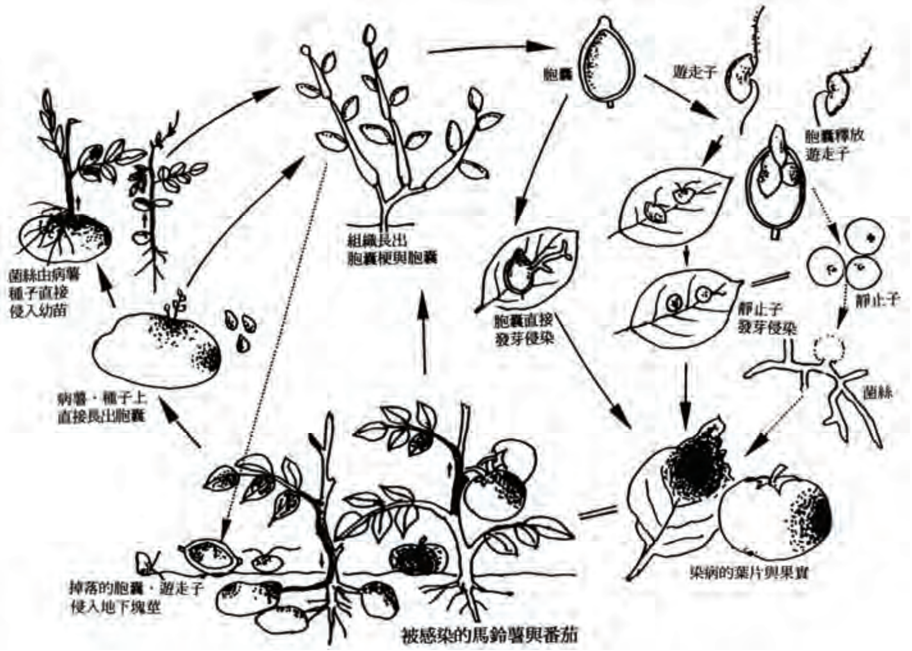
Fig. 1. Disease symptoms of potato late blight caused by *Phytophthora infestans*. (A). a disease field at Houli, Taichung in 1987; (B). infected potato tubers; (C). an infected plant; and (D). a lesion with sporangia on the leaf lower surface.



圖二、番茄晚疫病之病徵

Fig. 1. Disease symptoms of tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*. (A). an infected plant; (B). an infected stem; (C). an infected leaf; (D). infected blossom; and (E). infected fruits.

晚疫病之初次感染源來自帶菌種薯或土壤內罹病植株殘體中的菌絲與卵胞子。當環境合適時，病組織上長出胞囊，胞囊可釋放游走子，隨氣流與雨露飄落在健康組織上，發芽侵染馬鈴薯或番茄各部位，被感染之組織(主要為葉片背面) 約 3-5 天內即可長出大量胞囊，成為二次感染原，再向外擴散蔓延 (圖三)。完成一個無性世代，快則 3-5 天，可不經有性世代，循環不已。同絲型的晚疫病菌或與兩種不同配對型的晚疫病菌相遇時，會進行有性生殖，經減數分裂後，產生藏卵器與藏精器 (1N)，兩者結合後形成卵胞子 (2N)，進入休眠期，可存活 2~3 年，等環境合適時，發芽長出胞囊，再感染健康植株。



圖三、馬鈴薯與番茄晚疫病之疾病史(安繪)
Fig.3. The disease cycle of potato and tomato late blight caused by Phytophthora infestans

晚疫病在國內之發生情形與研究狀況

日人 Kawakami and Suzuki[25] 最早於 1908 年記載台灣的馬鈴薯與番茄發生晚疫病，1919 年 Sawada[26] 再增添兩種晚疫病菌之寄主植物，即耳

鉤草與龍珠。而後七、八十年來有關該病害與該菌之研究一直很少，正式報告亦不多[10,22]。究其原因，台灣地處熱帶與亞熱帶，大部分季節之氣溫均超過 25℃ (病菌生長溫度之上限)，不適合病害發生，在高冷地區，病害僅於夏季降雨較多時零星發生；在平地，亦僅在東北部於冬春季降雨時發生(一般為 12 月至翌春 4 月【清明節前後】)，由於病害輕微防治容易，因此未曾釀成重大災害。

直到 1997 年 12 月，冬季裡作的馬鈴薯栽培田，突然爆發嚴重的晚疫病，由后里地區迅速向四處擴散蔓延；同時間，番茄晚疫病亦是遍佈全國[5,14]。由於晚疫病一發生就如此猖獗，此現象與原因十分詭異。因而探討此次晚疫病大發生之原因與研擬防治策略，成為各界關注之焦點。

1997 冬季以後晚疫病在台灣大發生之原因探討

農試所與台灣大學為探究其病因，十多年來自各地分離晚疫病菌，至 2009 年為止，共採集 350 罹病田區，包括 101 馬鈴薯田與 249 番茄田，共獲得 1,581 株病菌，包括 409 馬鈴薯菌株田與 1,172 番茄菌株；將所有 1987 年之後分離到的新菌株與早年夏季自高山地區分離保存之晚疫病菌株 8 株作比較的結果顯示：新舊菌系均為 A^1 配對型，新舊菌系之胞囊大小與形態大致相似，但兩者之病原性、菌絲生長速率、生長溫度、抗藥性、及同種異型酶圖譜均有顯著之不同。新菌系可耐高溫達 27-(28)-29℃，舊菌系最高生長溫度僅有 25℃。於晚疫病菌最適生長溫度 20℃時，舊菌系每日直線生長速率平均為 0.42 mm，新菌系平均為 0.63 mm (其中 60 株之平均值)，約為舊菌系之 1.4 倍。舊菌系對滅達樂、依得利均無抗性，新菌系對達滅芬、亞拖敏、鋅錳歐殺斯、4-4 式波爾多液尚無抗藥性，但對滅達樂具強烈之抗性，滅達樂濃度 100 ppm 時，菌絲生長速率為對照處理之 61.4-145%。將其中 60 株新菌系測試，其對依得利亦有稍許抗性，濃度 10 ppm 時，菌絲生長速率為對照處理之 43.8-53%。新菌系對番茄、馬鈴薯均具強致病性，舊菌系之番茄菌株僅對番茄具病原性，馬鈴薯菌株則略對兩者具病原性。

進一步以同種異型酶譜、粒線體 DNA 限制片段長度多型性及 RG57 指紋圖譜等分子標記進行分析的結果顯示，隸屬舊菌系的 8 株晚疫病菌均為

Pep:92/100, Gpi:86/100，粒線體基因型為 Ib、RG57 指紋圖譜為 US-1。而 60 株代表新菌系之菌株皆為 Pep:100/100/111，Gpi:110/100，粒線體基因型為 IIb，且 RG57 指紋為 US-11 型或帶些微變異。由以上結果顯示，1997 年冬季以後出現在台灣平地之晚疫病為一新菌系，與先前存在本島高山地區之舊菌系完全不同，新菌系可能為由國外新侵入之單一菌系(24)。安與劉在 2008 年所進行的研究顯示，自**南投縣信義鄉**所收集的菌株之粒線體基因型均為 IIb，RG57 指紋圖譜為 US-11（劉,未發表資料），顯見目前新菌系幾乎已完全取代了舊有菌系。

結　語

自 1980 年以來，馬鈴薯與番茄晚疫病病菌 A^2 與同絲型菌株逐漸出現於歐洲及世界其他各國，且迅速崛起，凌駕於 A^1 之上，接踵而來的是許多病害防治相關問題，包括 (1) 晚疫病菌 A^2 菌株的毒性 (致病力，virulence) 很強，在歐美各國造成嚴重疫情。(2) 抗藥菌株出現，增加防治成本。(3) 許多抗病品種失去了抗性，縮短了使用年限 (即抗病性很快就被破解)，增加了育種困難。這些都是因為田間有兩種不同配對型的馬鈴薯晚疫病病菌同時存在所造成的結果；A^1 與 A^2 菌株行有性生殖，使病菌有機會進行染色體重組與基因交換，而在田間產生更多新的生理小種與抗藥菌株。目前我國之番茄與馬鈴薯晚疫病病菌「均仍為 A^1 配對型，並無 A^2 配對型存在」(11)。為防範晚疫病菌 A^2 配對型之入侵，行政院農委會動植物防疫檢疫局已將晚疫病菌 A^2 配對型列為檢疫禁止輸入病菌。

金柑疫病

金柑流膠立枯病之發生與防治

宜蘭地區金柑 (kumquat, *Fortunella margarita* swingle)，於 1994-1996 年，發生植株枝枯、流膠、萎凋、死亡現象，尤其於颱風降雨過後，整區果園出現急速萎凋、落葉及落果（圖四），於 1-2 個月內大量死亡，嚴重者

全園廢耕[3, 7]。該病害於 1990 年代已零星發生，但於 1994 年才發病嚴重，蔓延至整個金柑栽培區，1995 年礁溪鄉更有高達 80%以上之果園罹病，景況十分淒慘。植株外觀病徵多出現於降雨後，冬春季亦偶有發生。一般病徵為：單一枝條初現枯萎現象，繼而葉片黃化脫落，罹病枝條伴隨流膠或無，自新梢嫩枝至直徑十公分粗之樹幹均可被侵染。病斑可向樹幹上下蔓延，如擴展至主幹，將導致全株死亡。有時，一株有數枝條同時發病，病勢進展即十分快速。植株死亡後，重植幼苗均出現相同病徵，無法成活。將罹病樹幹之表皮切開，可見組織褐變，與健康部位之界限不明顯，病斑縱向蔓延的速度較橫向蔓延為快，因而常有植株半側死亡。一般發病嚴重植株之根系亦嚴重腐敗，但大部分病徵僅到接穗部位即停止，因此常有罹病植株接穗部位死亡後，根砧部份長出新芽的情形。在調查同時，柑橘屬的植株，包括文旦、柳橙、桶柑、海梨柑等並未發生此種疫情，顯示引起病害的病原菌對金柑具有寄主專一性。

圖四、金柑疫病之病徵

Fig. 4. Disease symptoms of kumquat Phytophthora blight caused by *P. citrophthora*. (A). a serously infected trees with (B) fallen leaves and fruit; and (C).a infected young tree with gummosis and bleeding.

將罹病組織採回，經組織分離，出現較頻繁之菌種依序為：*Fusarium solani, Phytophthora citrophthora, Lasiodiplodia theobromae, Pythium* spp. 及 *Penicillium* spp.。然而，經傷痍接種，僅有 *P. citrophthora* 可造成樹枝嚴重死亡與流膠，約有 90%之接種枝條出現病徵，病斑向基部蔓延，終至全株枯死;接種其他菌種者,僅有部份接種 *Fusarium* 與 *Lasiodiplodia theobromae* 之枝條壞疽，其餘均未發病。同時接種 *Phytophthora* 及 *Fusarium* 者，其病勢進展較單獨接種疫病菌者略為為快速。然而，無論有無接種 *Fusarium*，自接種疫病菌之發病枝條上均可分離出疫病菌與鐮胞菌，疫病菌多僅自病斑先端分離出，其他部位均被鐮胞菌纏據。

金柑一般以酸桔或廣東檸檬為砧木，將 *P. citrophthora* 金柑菌株直接接種於酸桔實生幼苗，僅引起接種部位壞疽，並不會造成植株死亡；同樣的，將金柑疫病菌接種於其他柑橘屬幼苗時(包括文旦、椪柑、桶柑與麻豆文旦)，亦僅造成接種部位枯萎，病斑長度蔓延到 5-10 cm 時即停止，並不會造成植株流膠或死亡，此與田間並未發現柑橘屬植株罹病之情形吻合。但將金柑疫病菌菌株接種於金柑/酸桔時，病斑可自金柑接穗擴展至酸桔砧木，造成全株死亡。此外，自病區採土，種植金柑/酸桔幼苗，一年後，80%以上之植株死亡；而種植於健土 (水田土) 之植株均未死亡。由於 *P. citrophthora* 為台灣柑橘之重要疫病菌之一，中部與北部地區的柑橘園內十分普遍[9]，因此將從柳橙、椪柑、桶柑、茂股柑及文旦分離的 *P. citrophthora* 接種於金柑幼苗，這些柑橘屬 *P. citrophthora* 菌株僅引起輕微的芽葉枯萎，並不會導致金柑流膠、立枯及死亡結果，顯示為害金柑的 *P. citrophthora* 與為害柑橘屬的 *P. citrophthora* 並不相同[3]。

將發病輕微之金柑噴佈福賽得 (200X) 或鋅錳滅達樂 (1000X)，約每 2-4 星期一次，共施用 4-5 次，病株可逐漸恢復健康。而溫室金柑幼苗在噴灑亞磷酸 (1000 ppm) 兩次後，再接種疫病菌，病勢亦甚輕微，僅有壞疽斑。

金柑疫病菌之鑑定與病害發生原因

為瞭解金柑疫病之發生原因，自 1995 年至 2007 年一共調查 14 縣市 200 個芸香科植物果園，結果 23 果園分離到柑橘疫病菌 *P. citrophthora*，共獲

得 82 菌株，均為 A[1]配對型，其中 35 菌株分離自金柑，其他 47 菌株分離自柑橘屬(*Citrus* sp.)。金柑菌株(菌系)與柑橘屬菌株(菌系)的形態與生理特性大致相同，但仍有差異，包括兩者的菌落型態不同，在 PDA 上金柑菌株具有濃厚的氣中菌絲，柑橘菌系為平鋪的放射狀；金柑菌系產生的胞囊較多且對金柑的致病力較強。兩者之菌絲蛋白質電泳圖譜亦略有差異。兩者間 ITS1-5.8SrDNA-ITS2 的序列相同度達 97-98%，金柑菌系的 ITS 序列長度為 779 bp，彼此間相同度為 99-100%；柑橘屬菌系的 ITS 序列長度為 782-784 bp，主要為 783 bp，彼此間相同度亦為 99-100%。與柑橘屬菌系比較，所有金柑菌系在 ITS1 有 4 處鹼基對缺遺與 2 處鹼基置換，而在 ITS2 有 6 處鹼基置換。類緣分析結果顯示金柑菌系與柑橘屬菌系均各自歸為一群 (clade)，且兩者間之親緣關係較與其他寄主分離到的 *P. citrophthora* 為遠[(12)]。

結　語

綜合試驗結果，判定宜蘭地區金柑死亡之原因為：颱風豪雨導致枝幹受傷，同時將根部與土壤中之疫病菌攜帶至傷口，造成初次感染，而且土壤淹水後導致樹勢衰弱，助長 *Fusarium* 與 *Lasiodiplodia* 等菌之二次感染，造成植株於短時間內大量急速死亡。由於為害金柑的疫病菌 *P. citrophthora* 與為害柑橘屬的 *P. citrophthora* 在形態、病原性及分子特性有相當差異，作者認為近年台灣新發生之金柑疫病非由本土柑橘屬菌系引起[(12)]。

番椒疫病菌

番椒疫病菌的發現與病害

Phytophthora capsici Leonian (番椒疫病菌) 是茄科與葫蘆科作物的重要病原菌，在台灣的最早的記錄為高與呂氏於 1977 年報告 *P. capsici* 危害甜椒及茄子[(6)]。目前在我國已確定的 *P. capsici* 寄主有 17 屬 24 種作物 (表二)，重要者包括：甜椒、辣椒、chili pepper、番茄、茄子、西瓜、洋香瓜、康乃

馨、滿天星及胡椒科的枸醬等[8, 23]。*P. capsici* 主要為害作物的莖基部 (包括番椒、番茄幼苗、康乃馨、滿天星、枸醬) 與果實 (番椒、茄子、瓜類)，造成嚴重的經濟損失，尤其是連續降雨與颱風過後，病勢進展十分迅速，常造成全園廢耕（圖五＆六）。

表二、番椒疫病菌 *Phytophthora capsici* 在台灣之寄主記錄
Table 2. List of hosts of *P. capsici* found in Taiwan

寄主植物	危害部位	經濟重要性[a]	分 佈	發現年代	最早文獻
番椒(含甜椒、辣椒、朝天椒等)	莖基部、果實、幼苗全株	+++	全台灣	1976	高與呂(1977)
茄子	果實	+++	全台灣	1977	高與呂(1977)
番茄	幼苗全株、莖、葉、果實	+++	全台灣	1981	呂與高(1981)
蘆薈	葉		南投	1981	呂與高(1981)
西瓜	果實	+++	所有栽培區	1981	呂與高(1981)
洋蔥	鱗片、莖		屏東	1981	呂與高(1981)
吊鐘花	莖、根		南投	1981	呂與高(1981)
枸醬	根、莖基、葉、果實	+++	南投、台南、台東	1981	呂與高(1981)
石竹	莖基、根	++	嘉義、南投	1981	呂與高(1981)
胡瓜	莖基、果實	++	嘉義	1983	張(1983)
康乃馨	莖基	+++	嘉義、南投	1987	安等(1988), Ann *et al*. (1990)
洋香瓜、美濃瓜	果實	+++	所有栽培區	1990	Ho (1990)
玩具南瓜	莖、果實		嘉義	1990	Ann and Ko (1990)
滿天星	莖基	+++	南投、台中	1990	Ann and Ko (1990), 安與劉 (1993)

寄主植物	危害部位	經濟重要性[a]	分 佈	發現年代	最早文獻
花豆	全株	+	台中、花蓮	1990	Ho (1990)
波斯菊			南投	1990	Ho (1990)
大理花	莖基	++	南投	1990	Ann and Ko (1990), Ann (2000)
龍葵			南投、台中	1995	陳與謝(1995)
南瓜	果實、莖、葉	+++	台中、南投	1996	安等(2010)
蒲瓜	果實、莖、葉	+++	台中	2009	安等(2010)
飄香籐	莖、花器、葉	++	彰化	2009	安等(2010)
羅勒	莖基部	+	南投	2010	安 (未發表)
冬瓜	果實、莖、葉	+++	台中	2010	安 (未發表)

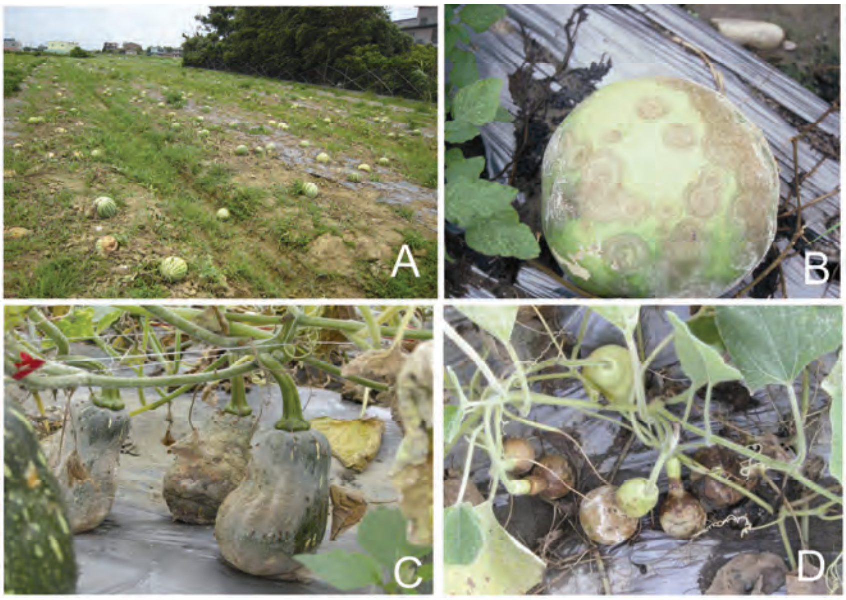
a. 經濟重要性：+++，重要；重要；++，中等；+，輕微。

番椒疫病菌同絲型 (偏 A2) 菌系的崛起

自從 *P. capsici* 在台灣浮現後，30 年來所有出現在我國的 *P. capsici* 均為 A^1 配對型， 直到 2007 年 4 月，在台中霧峰地區的茄子果實上首次同時分離到 A^1 與 A^2 配對型的 *P. capsici*，為台灣最早出現 *P. capsici* A^2 的記錄(2)；同年 6 月則在番茄病株上檢出 A^2 型的 *P. capsici*，同年在其他作物上分得的菌株仍為 A^1 配對型。次年，2008 年 A^2 型的新增加寄主為番椒與甜椒，該年 A^1 與 A^2 型 *P. capsici* 菌株的分離比為 9 (25%)：27 (75%)。2009 年 *P. capsici* A^2 的寄主範圍更擴增至各種觀賞辣椒、瓜類 (包括南瓜與扁蒲)、荖葉及觀賞植物飄香藤；該年 A^1 與 A^2 型菌株的分離比率為 6 (11.7%)：46 (87.2%)。2010 年更在冬瓜、羅勒等作物亦分離到 A^2 菌系的 *P. capsici*，分離到 A2 菌系的比率高達 96.5%，目前除了東部地區及高山地區尚可分離到 A^1 型外，其他地區的 *P. capsici* 已完全被 A^2 型取代，A^2 型已逐漸成為 *P. capsici* 在台灣的優勢配對型(4)。爾後發現，該 A^2 菌系並非“標準 A^2”配對型，所有所謂的 A^2 菌株在單獨培養 20-30 天後，均可形成為數不少的卵胞子，應歸類為同絲型，但它如果與 A^1 菌株配對後則可於 6 天內形成大量卵胞子，可以說是偏 A^2 型的同絲型(簡稱同絲型偏 A^2)。

圖五、番椒疫病為害茄科作物時之病徵

Fig. 5. Disease symptoms of Solanaceae corps caused by *Phytophthora capsici*. (A). a seriously infected pepper field; (B) basal stem rot and (C). fruit rot of sweet peppers; (D) fruit and stem rot of pepper; and (E) fruit rot of egg plant.



圖六、番椒疫病為害葫蘆科作物時之病徵

Fig. 6. Disease symptoms of cucurbit crops caused by *Phytophthora capsici*. (A). a seriously infected watermelon field and (B) a fruit with many diseased lesions; (C). squash fruit rot; and (D) bottle gourd fruit rot.

番椒疫病菌同絲型(偏 A^2)菌系之特性

在形態方面，兩配對型的有性器官的形態與大小亦十分相近，同絲型(偏 A^2)菌株的藏卵器、卵胞子及藏精器平均大小分別為 32-39 µm，26-33 µm，11-18 × 12-17 µm (A^1 為 32-37 µm，26-33 µm，11-18 × 12-17 µm)。然而在無性生殖方面，同絲型(偏 A^2)形成的胞囊數量較多，胞囊多為橄欖形、檸檬形或常橢圓形，乳突明顯、單一或雙乳突，胞囊較狹長、長寬比 (L/B) 為 1.6-1.8 (A^1 為 1.3-1.5)，胞囊脫落率較高、胞囊柄 (pedicels) 較長，平均 40-58 µm (A^1 約為 5-10 µm)，胞囊大小平均 57-64 × 34-40 µm (A^1 為 60-61 × 40-44 µm)。在溫度反應方面，兩種配對型菌絲生長時對溫度的反應與最適溫度均相似，為 8-12-(24-28)-36℃；在影響產胞方面，同絲型(偏 A^2)菌系較嗜高溫 (最適溫為 28-32℃，A^1 菌系為 24℃)。

在滅達樂耐性方面，大部分 A^1 與同絲型(偏 A^2)菌株均不具抗性，但極少部份具高抗性，在 100 ppm 高濃度下幾無抑制。

在病原性方面，與 A^1 菌株相比較，同絲型(偏 A^2)菌株對蕃茄、甜椒、茄子的毒性均較強，發病率較高、病徵出現較早且病勢進展較快。此外將 A^2 菌株接種於番茄與甜椒組織時，亦會產生大量的卵胞子，有利該菌在田間的存活，提升其競爭力，與其成為優勢種有關。

此外，分析 A^1 與同絲型(偏 A^2)菌系之核醣體內轉錄區間的 DNA 序列發現，其 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 序列全長均為 753 bp，所有菌株僅有 6 處多型 (dimorphic) 或相異，相似度高達 99.2-100%，同絲型 (偏 A^2) 菌系間可以分為 3 群；分析 β 微管蛋白的部份 DNA 序列(長度為 651 bp)，僅有 8 處相異，相似度高達 98%以上，同絲型(偏 A^2)菌系可以分為 9 群。從以上特性尚無法判斷台灣 A^2 菌株崛起之原因 [(4)]。

結　語

目前台灣的番椒疫病菌之田間菌相已由 A^1 配對型逐漸轉換成同絲型（偏 A^2）菌系， 由於所有的同絲型偏 A^2 菌系較嗜高溫，其毒性均較 A^1 菌系為強，發病較早，病勢進展較快。由於田間出現同絲型菌株，或同時

出現同絲型與 A[1] 菌系，田間菌株間進行有性生殖的機會大增，菌株間基因互換與重組的機率亦相對提高，病菌演化速率加快，對我國茄科與葫蘆科作物的危害將更大。

結　論

疫病為世界上最重要的植物病害之一，目前新種與新菌系持續增加，並在國際間造成重大疫情，導致經濟與生態上的重大損失。為防範疫病的危害，除了要掌握病害在國際上的發生動態外，亦要對重大疫病菌建立快速精準的診斷鑑定流程，開發經濟有效的防治技術，以保護國內作物之健康生長。

參考文獻

1. 安寶貞、王姻婷、黃晉興、蔡志濃、王三太. 2008a. 莧菜疫病. 植病會刊 17:69-70.
2. 安寶貞、王姻婷、蔡志濃. 2008b. 台灣出現 A[2] 配對型的 *Phytophthora capsici*. 植病會刊 17:69. (摘要)
3. 安寶貞、吳雅芳、林慶元. 1997. 宜蘭地區金柑急速萎凋死亡病因之探討與病害防治. 植病會刊 6:198. (摘要)
4. 安寶貞、邱燕欣、王姻婷、蔡志濃. 2010. A[2]配對型 (或同絲偏A[2]型) *Phytophthora capsici*在台灣之崛起及與A[1]型特性之差異. 植病會刊 19: 78. (摘要)
5. 安寶貞、張東柱、蔡志濃. 1998. 臺灣晚疫病菌(1998 年前後)新舊菌系特性之比較. 植病會刊 7: 209. (摘要)
6. 呂理燊、高清文. 1981. *Phytophthora capsici* 引起之甜椒及辣椒之疫病. 植保會刊 23:59-66。
7. 邱安隆、林慶元、安寶貞. 2002. 金柑疫病菌之生態與防治. 植保會刊 44:366-367.

8. 徐世典等. 2002. 台灣植物病害名彙 (第四版). 中華民國植物病理學會出版. 台中. 386 頁。
9. Ann, P. J. 1984. Species, mating types and pathogenicity of *Phytophthora* distributed in citrus orchards in Taiwan. Trans. Br. Mycol. Soc. 82:631-634.
10. Ann, P. J., Chang, T. T., and Chern, L. L. 1998. Mating type distribution and pathogenicity of *Phytophthora infestans* in Taiwan. Bot. Bull. Acad. Sin. 39:33-37.
11. Ann, P. J., Tsai, J. N., Wang,T.C., Chen, C. H., Lin, M. J. & Ko, W. H. 2010. Reevaluation of the report of A^2 mating type of *Phytophthora infestans* on tomato in Taiwan. Botanical studies 51: 203-207.
12. Ann, P. J., Wang, I. T. Tsai, J. N. and Liou, R. F. 2008. (S2.9) Comparison of isolates of *Phytophthora citrophthora* attacking *Fortunella margarita* (Kumquat) and *citrus* species in Taiwan. J. Plant Pathol. 90 (2, Supplement), S2. P.445 (Abstract)
13. Brasier, C. 2009. *Phytophthora* biodiversity: How many *Phytophthora* species are there? p. 101-115 in "Phytophthoras in forests and natural ecosystems, Proceedings of the Fourth Meeting of IUFRO Working Party S07.02.09", August 26–31, 2007, Monterey, California.
14. Deahl, K. L., Cooke, L. R., Black, L. L., Wang, T. C., Perez, F. M., Moravec, B. C., Quinn, M. and Jones, R. W. 2002. Population changes in *Phytophthora infestans* in Taiwan associated with the appearance of resistance to metalaxyl. Pest Manag. Sci. 58:951-958.
15. De Bary, A. 1876. Researches into the nature of the potato fungus, *Phytophthora infestans*. J. Roy. 2gric. Soc., Ser. 2, 12:239-269. (Abstract)
16. Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS press, St. Paul. Minnesota, 562 pp.
17. Fry, W. E., and Goodwin, S. B.1997. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. Plant Dis. 81:1349-1357.
18. Galindo, A. J., and Gallegly, M. E.1960. The nature of sexuality in

Phytophthora infestans. Phytopathology 50:123-128.

19. Gallegly, M. E., and Hong, C. 2008. Phytophthora: Identifying species by morphology and DNA fingerprints. APS press, St. Paul. Minnesota, 158 pp.
20. Goodwin, S. B., Drenth, A., and Fry, W. E. 1992. Cloning and genetic analyses of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. Curr. Genet. 22:107-115.
21. Griffith, G. H., and Shaw, D. S.1998. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR mplification of DNA from pure cultures or from host lesions. Appl. Environ. Microbiol. 64:4007-4014.
22. Hartman, G. L., and Huang, Y. H 1995. Characteristics of *Phytophthora infestans* isolates and development of late blight on tomato in Taiwan. Plant Dis. 79: 849-852.
23. Ho, H. H., Ann, P. J., and Chang, H. S. 1995. The Genus *Phytophthora* in Taiwan. Acad. Sin. Mo. Ser. 15. 86 pp.
24. Jyan, M. H., Ann,P. J., Tsai, J. N., Hsih, S. D., Chang,T. T. and Liou, R. F. 2004. Recent occurrence of *Phytophthora infestans* US-11 as the cause of severe late blight on potato and tomato in Taiwan. Can. J. Plant. Pathol. 26:188-192.
25. Kawakami, T., and Suzuki, R 1908. List of fungi on cultivated plants of Formosa, Part I. Bull Agric. Exp. Sta. Gov. Formosa. 1: 1-64.
26. Sawada, K.1919. Descriptive catalogue of the Formosa fungi I. Bull Agric. Exp. Sta. Gov. Formosa. 19:74-80. (in Japanese)
27. Tooley, P.W., Fry, W.E., and Villarreal Gonzalez, M.J.1985. Isozyme characterization of sexual and asexual *Phytophthora infestans* population. J. Heredity 76:431-435

ABSTRACT

Studies on three important Phytophthora diseases in recent year in Taiwan

Ann Pao-jen [1,3]、Liou, Ruey-Fen [2]、Tsai, Jyh-Nong[1]

[1] Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, COA;

[2] Department of Plant Pathology and Microbiology, National Taiwan University

[3] Corresponding author, Email: pjann@tari.gov.tw

Phytophthora deBary are important plant pathogens distributed world wide. Currently, there are about hundreds good species of *Phytophthora* have been formally described and documented in the world. Among them 30 species are distributed in Taiwan. Some of them have caused severe economic loss in recent year, including that (1) *Phytophthora infestans* US11 caused potato and tomato late blight since 1997；(2) a new strain of *P. citrophthora* induced kumquat blight and decline from 1985 through to 1987; and (3) the homothallic strain (with A^2 tendency) of *P. capsici* appeared and attacked solanaceae and cucurbit crops seriously since 2007.

Key words：important Phytophthora diseases, Phytophthora late blight, kumquat, solanaceae, cucurbit, *Phytophthora infestans* US11, *P. citrophthora*, homothallic *P. capsici*.

褐根病之發生、診斷鑑定及防治

蔡志濃[1,3]、安寶貞[1]、謝文瑞[2]

[1] 行政院農業委員會農業試驗所

[2] 國立中興大學植物病理學系

[3] 聯絡作者，電子郵件信箱：tsaijn@tari.gov.tw

摘　要

近年來，台灣許多重要經濟果樹、觀賞植物與林木常發生生長衰退、落葉、萎凋而終至枯死之現象。已證實主要原因為罹患褐根病(brown root rot)，病害由 *Phellinus noxius* (Corner) G. H. Cunningham 引起。*Phellinus* spp. 分類地位屬擔子菌門，層菌綱(*Hymenomycetes*)，無褶菌目(*Aphyllophorales*)，刺革菌科(*Hymenochaetaceae*)，木層孔菌屬(*Phellinus*)。在分類上分為 5 個群(group)，目前有 154 個種(species)和 67 個變種(form and varieties)。本菌菌絲不具扣子體，在馬鈴薯葡萄糖瓊脂（PDA）上生長時，菌絲初為白色，而後轉成深淺不規則之褐色塊狀。部份菌絲會斷裂成斷生孢子(arthrospores)或特化成褐色的鹿角菌絲（trichocyst），生長溫度為 10～36 ℃，最適生長溫度為 28～32 ℃，最適生長酸鹼值為 pH 4.5～7.0。*P. noxius* 在自然界於感染的植物上很少形成子實體，於發現之寄主中僅在九種寄主植物上發現子實體，分別為龍眼、荔枝、番荔枝、木麻黃、鳳凰木、樟樹、榕樹、印度橡膠樹及山刈葉等，子實體為不規則之覆瓦狀，反轉孔面朝上，菌絲層初為乳白色至黃褐色，而後褐化成黑褐色或深灰褐色。擔孢子無色透明、單室、橢圓形，大小 3.8-6.3 x 1.5-5.0 μm。褐根病的病徵可分為慢性與急性立枯兩種，與其他病菌引起的立枯病徵相似；而根部病徵特異，罹病木材變褐色，腐朽後並長出褐色網狀線紋。病根的表皮上覆有褐色菌絲塊，並黏沾土塊石粒，故稱為褐根病。褐根病菌為多犯性，寄主範圍廣泛，在台灣之寄主記錄超過 130 餘種，無論是果園、觀光區、校園、行道樹、

或是住家庭院，經常可見到該病害的蹤影。褐根病主要靠健康根與病根的接觸、種苗帶菌、或帶菌病土傳播，病菌可在殘根中存活 5-10 年以上。1991-2006 年自台灣各地的 33 種寄主植物收集到 80 株 *P. noxius* 菌株。經 rDNA 序列分析比對發現，主要分為 2 種序列型態，63 個菌株為 type L，序列長度為 614 bp 以及 17 個菌株為 type S 長度 606 bp。在菌株親緣分析方面：*P. noxius* 各菌株間之親緣性距離較近，相同度(identity)皆在 99%以上。進一步依據 ITS 區域設計專一性引子對，正向引子 PN-1F (5’-agtttgcgctcatccatctc-3’) 和反向引子 PN-2R (5’-agccgacttacgccagcag-3’)，利用 PCR 技術針對供試之 *P. noxius* 菌株進行分子診斷，均可增幅出 414 bp 或 422 bp 長度之序列片段；其它菌株皆無法增幅出任何片段，且靈敏度可達 0.01 ng。進一步以龍眼樹及相思樹根部組織進行田間試驗，亦可在罹病植株增幅出預期之片段。因此本研究所設計之引子對 PN-1F/PN-2R 能用來快速診斷褐根病與輔助鑑定 *P. noxius*。試驗室篩選 45 種藥劑，選出抑制褐根病菌菌絲生長較佳之藥劑七種，包括滅普寧(Mepronil)、普克利(Propiconazole)、三泰芬(Triadimefon)、撲克拉(Prochloraz)、佈生(TCMTB)、依滅列(Imazalil)、三得芬(Tridemorph)等。另外利用尿素 3000 ppm 及淹水處理亦能有效防治褐根病。於南投水里地區一發病的葡萄園進行田間試驗，處理方法為，每株 3 年生的葡萄灌注三泰芬＋尿素＋碳酸鈣、撲克拉＋尿素＋碳酸鈣溶液，每種藥劑的用量均為每株 10 g，將藥劑溶水中，沿根圈樹冠灌注，每三個月灌注一次，防治效果顯著。

關鍵詞：褐根病、生態、防治策略、*Phellinus noxius*

緒　言

褐根病為亞洲、非洲、大洋洲及澳洲熱帶與亞熱帶地區果樹、特用作物及林木重要之根部病害，病原菌危害根部，造成根部腐敗無法輸送水分，而導致全株萎凋枯死。在非洲主要危害之經濟作物為橡膠樹(*Hevea brasiliensis*)[38]；在東南亞主要危害之作物為橡膠樹、茶樹[17,36]、油椰子、椰子及相思樹[13]等；在大洋洲主要危害作物為大葉合歡、洋蹄甲、木麻黃、

非洲刺桐、白皮銀合歡、繖楊、麵包樹及柑橘等[32]；在台灣於 1928 年澤田兼吉(Sawada)報導在樟樹、龍眼、月橘等作物有 *Fomes lamaoensis* (Murr.)Sacc. et Trott.所引起之立枯病，其病徵之描述與由 *Phellinus noxius* (Corner) G. H. Cunningham 所引起之褐根病病徵非常相似。國外褐根病寄主主要為林木及特用作物；在台灣，雖然早在 1928 年澤田兼吉就有記錄，但之後並無研究人員從事相關之研究，直到 1985 年農業試驗所安寶貞博士及夏威夷大學柯文雄教授於台灣南部發現很多龍眼樹立枯死亡，經分離、培養及接種試驗，證明龍眼之枯死係罹患褐根病，而病原菌名稱於 1990 年才經由柯文雄教授及林業試驗所張東柱博士鑑定為 *P. noxius*。有關褐根病之研究報告，國外大多為病原菌之記錄，對於生態及病害防治未有深入研究；而台灣則於 1990 年後才陸續有褐根病菌之寄主報告，及有關生態與防治之初步研究報告。近幾年來，台灣許多林木、木本觀賞植物及經濟果樹備受褐根病菌之威脅，已逐漸受到重視，因此，褐根病菌之生態及病害防治，更應有深入之研究。

病原菌之分類地位及特性

新加坡學者 Corner 於 1932 年首先命名褐根病菌為 *Fome noxius* Corner[25]，至 1965 年學者 Cunningham 重新命名為 *Phellinus noxius*[26]，本病原菌之同物異名有 *Hymenochaete noxia* Berk. ex Cke、*Poria setulosocrocea* Clel. et Rodw、*Poria cacao* Pat.、*Fomes cacao* Pat.、*Fomes lamaoensis* 及 *Fomes noxius* 等。*P. noxius* 的分類地位為擔子菌門(*Basidiomycota*)，層菌綱(*Hymenomycetes*)，無褶菌目(*Aphyllophorales*)，刺革菌科(*Hymenochaetaceae*)，木層孔菌屬(*Phellinus*)。*Phellinus* 屬以剛毛(setae)的有無及擔孢子的顏色分為 5 群(group)，目前有 154 個種和 67 個變種(form and varieties)，*P. noxius* 屬於第 1 群。刺革菌科的主要特徵為菌絲不具扣子體(clamp connection)，不具有菌褶(gill)，且本科包含之所有菌皆為木材白色腐朽菌(white rotter)，本科共有 10 個屬，木層孔菌屬為刺革菌科最大的屬，多數營腐生或具有弱病原性，少數菌種具有較強之病原性，如 *P. noxius*、*P. pini*

及 *P. weirii* 等。

P. noxius 菌絲為二次元菌絲(secondary mycelium)，含有不具扣子體的生長菌絲(generative hyphae)及骨骼菌絲(skeletal hyphae)，生長菌絲直徑為 2-4 µm，無色至黃色，骨骼菌絲為黃褐色至深褐色，直徑 3-6 µm。本菌在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基（PDA）上生長時，菌落初為白色，而後轉成深淺不規則之褐色塊狀(圖一)。部份菌絲會斷裂成斷生孢子(arthrospore) (圖二)或特化成褐色的鹿角菌絲（trichocyst）(圖三)，生長溫度為 10～36 ℃，最適生長溫度為 28～32 ℃，最適生長酸鹼值為 pH 4.5～7.0[3,12]。*P. noxius* 在自然界感染的植物很少形成子實體，於發現之寄主中僅在九種寄主植物發現子實體，分別為龍眼、荔枝、番荔枝、木麻黃、鳳凰木、樟樹、榕樹、印度橡膠樹及山刈葉等，子實體為不規則之覆瓦狀，反轉孔面朝上，於子實體菌絲層初為乳白色至黃褐色，而後褐化成黑褐色或深灰褐色，子實體表面滴上 3-5％ KOH，將會變為黑色。擔孢子無色透明、單室、橢圓形，大小 3.8-6.3 x 1.5-5.0 µm [14]。在木層孔菌屬中，目前僅知 *P. noxius* 可在人工培養基中形成鹿角菌絲和斷生孢子，因此可做為本菌的鑑定依據。在病組織上可發現鹿角菌絲，但未發現斷生孢子。

寄主及地理分佈

褐根病的病徵可分為慢性與急性立枯兩種，從黃化到整株枯死只需一至三個月者，屬於急性立枯(圖四)，造成急性立枯的主要原因為 *P. noxius* 危害樹木的輸導組織，導致水份及養份之輸送受到阻礙而死亡，與其他病菌如白紋羽病菌(*Rosellinia necatrix*)及靈芝病菌(*Ganoderma* spp.)引起的立枯病徵相似；但根部病徵特異，罹病木材變褐色，腐朽後並長出褐色網狀線紋(圖五)，病根的表皮上覆有褐色菌絲塊(圖六)，並黏沾土塊石粒。褐根病菌為多犯性，寄主範圍廣泛，早期 Sawada 記錄台灣有 18 種寄主[10,11,12]，目前全世界超過 200 餘種，在國外主要危害咖啡[31]、茶[36]、油椰子、破布子[39]、橡膠樹[38]、可可[27]、樹豆[28]、松樹[18]等；在台灣之寄主記錄超過 120 餘種，涵蓋多種果樹、觀賞植物與林木[19,20,21,23]。危害果樹之記載，於國外

僅有柑橘[32] 及可可[27]；在台灣則有山刺番荔枝、番荔枝、鳳梨釋迦、波羅蜜、楊桃、柑橘、龍眼、柿樹、橄欖、枇杷、愛玉子、荔枝、馬拉巴栗、酪梨、梅、桃、櫻花、梨、蘋婆、蓮霧、葡萄等 21 種(表一)。該病害主要分佈於熱帶與亞熱帶地區，包括東南亞、非洲、加勒比海、大洋洲、澳洲、海南島及琉球，台灣主要分佈於中、南部及東部地區，海拔 1000 公尺以下之山坡地與平原，無論是果園、觀光區、校園、行道樹、或是住家庭院，經常可見到該病害的蹤影。林試所張氏報導分離自 12 種寄主之 *P. noxius*，將每一菌株都接種到 12 種寄主，發現都可引起 12 種植物發病，此結果顯示 *P. noxius* 不具寄主專一性。

生理及生態

P. noxius 於 PDA 培養基上測定，最適生長酸鹼值為 pH 4.5～7.0，檢測罹患褐根病寄主植物根圈土壤之酸鹼值，結果顯示土壤 pH 值於 4-9 均可發現褐根病，其中以 pH 5-8 的比例較多[24]。*P. noxius* 能分泌纖維分解酵素及木質分解酵素[29]，造成木材白腐。

褐根病發病地區常發現病害自一發病中心逐漸向四周擴散，此現象顯示褐根病的傳播主要經由根部接觸由病根傳給健根，雖然有報導證明擔孢子可以成功感染植物，但因 *P. noxius* 在自然界不易形成子實體，因此經由擔孢子做長距離傳播的機會較少，依據夏威夷大學柯氏報告，種苗帶菌為長距離傳播的主要方式之一，褐根病主要靠健康根與病根的接觸、種苗帶菌、或帶菌病土傳播，病菌可在殘根中存活 5-10 年以上。林試所張氏調查田間瓊崖海棠、木麻黃及樟樹之殘根，發現死亡後一年至十年的病根均可以分離到 *P. noxius*，死亡時間愈短，病原存活的比例愈高，死亡十年後之木麻黃病根仍有 50 %以上的存活率，可見 *P. noxius* 危害作物的殘根可以在土壤內長期的存活。林試所張氏曾於溫室中，將感染 *P. noxius* 的木材、斷生孢子、擔孢子及菌絲放入不同含水率的土壤中，斷生孢子和擔孢子在五個月後，於各種含水率的處理中，皆無法檢測到 *P. noxius* 的存在，菌絲則在 12 個星期後，於各種含水率的處理中無法檢測到 *P. noxius* 的存在，且含水

率愈高，其存活時間愈短[(24)]。感染 *P. noxius* 的木材除浸水處理外，經過二年仍有高達 80 ％以上的存活率，但浸水之木材，一個月後則無法檢測到 *P. noxius* 的存活。*P. noxius* 在浸水狀態下的殘根存活能力較差，在含水較少的狀態下殘根存活時間較長。

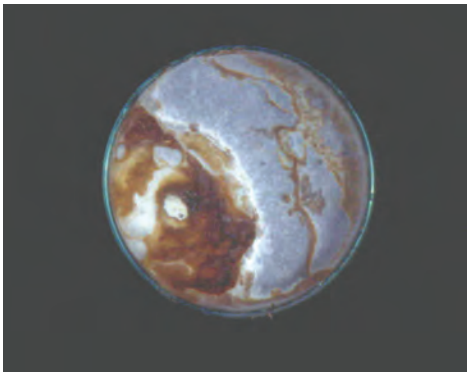
表一、*Phellinus noxius* 在世界上之果樹寄主記錄

Table 1. List of fruit tree host records of *Phellinus noxius* in the world

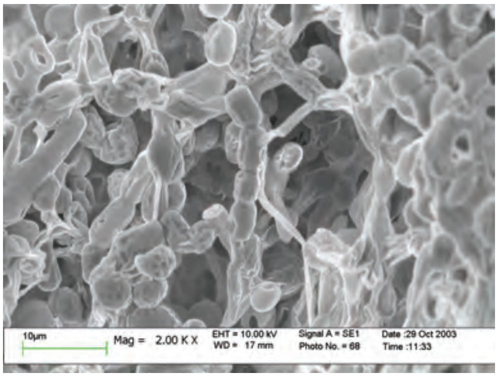
Scientific name (common name)	Reported in Taiwan	Citation
Annona Montana (mountain soursop)	+[1]	1,2
Annona squamosa (custard apple)	+	3,6,16
Annona squamosa x *A . chrrimola* (atimoya)	+	U[2]
Artocarpus heterophyllus (jack fruit)	+	24
Averrhoa carambola (carambola)	+	2
Citrus poonensis (mandarin orange)	+	5,32
Dimocarpus longan (longan)	+	8,10,14,15
Diospyros kaki (persimmon)	+	3,16
Elaeocarpus serratus (Ceylon olive)	+	24
Eriobotrya japonica (loquat)	+	16
Ficus pumila var. awkeotsang (jellyfig)	+	4,6,16
Litchi chinensis (litchi)	+	16
Muntingia calabura (Indian cherry)	+	U
Ochroma pyramidale (cocoa)	-	27
Pachira macrocarpa (Malabar chestnut)	+	2
Persea americana (avocado)	+	5
Prunus mume (Japanese apricot, plum)	+	7,16
Prunus persica (peach)	+	2
Pyrus pyrifolia (pear)	+	16
Sterculia nobilis (ping-pong)	+	2
Syzygium samarangense (wax apple)	+	14,16
Vitis vinifera (grape)	+	1,16

1.+: reported in Taiwan; -: not reported in Taiwan.

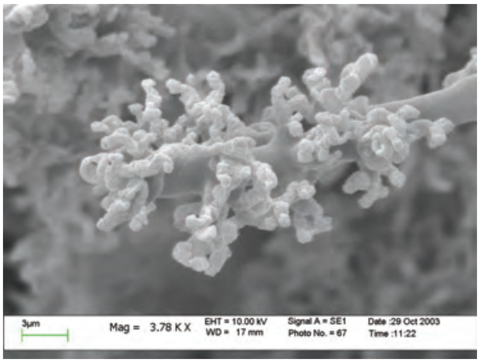
2.U: unpublished.



圖一、*Phellinus noxius* 在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基（PDA）上之菌落形態。
Fig. 1. Colony of *Phellinus noxius* on potato dextrose agar (PDA).



圖二、*Phellinus noxius* 在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基（PDA）上產生斷生孢子。
Fig. 2. Arthrospores of *Phellinus noxius* produced on potato dextrose agar (PDA).



圖三、*Phellinus noxius* 在馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基（PDA）上產生毛狀菌絲。
Fig. 3. Trichocysts of *Phellinus noxius* on potato dextrose agar (PDA).

圖四、*Phellinus noxius* 危害造成荔枝植株立枯死亡。
Fig. 4. A litchi tree killed by *Phellinus noxius*.

圖五、*Phellinus noxius* 危害龍眼樹根部組織腐朽後，長出褐色網紋狀菌絲束。
Fig. 5. Brown mycelial strings of *Phellinus noxius* permeated on a decomposed wood tissue of longan.

圖六、感染 *Phellinus noxius* 之龍眼根部長出病菌褐色菌絲塊。
Fig. 6. Outer surface of an infected longan root tissues with brown mycelial mats of *Phellinus noxius*.

褐根病診斷鑑定技術

雖然，褐根病為造成台灣樹木死亡的第一要因，然而引起樹木死亡的其他原因眾多，經常造成誤判的情形，影響病害的及時防治。因此研發出簡單的診斷鑑定方法如下：（依序）

1. 樹木出現急性或慢性立枯症狀。觀察樹冠基部與裸露之根系，如果長出褐色菌體，即可斷定罹患褐根病。如無，進行 2 之步驟。
2. 挖開土壤，如果樹根上長有褐色菌體，剝去樹皮後，組織上有網紋狀菌絲束，即可斷定罹患褐根病。如無進行 3 之步驟。
3. 將罹病根切（鋸）下一段，對半劈開，密封於塑膠袋內，於室溫下(25-30℃)經過 1-2 天，如為褐根病病根，組織表面會長出褐色菌體，即可斷定為褐根病。
4. 進行病組織分離工作。
5. 褐根病菌 *Phellinus noxius* 檢測用專一性引子對之開發：

以分離培養之 *Phellinus noxius*、*Phellinus aplahynus*、*Phellinus gilvus* 、*Phellinus laevlgatus*、*Phellinus hoehnelii*、*Phellinus igniarius*、*Phellinus lnermis*、*Phellinus mombranaceus*、*Kretzchmaria* spp.、*Ganoderma australe*、*Ganoderma tropicum*、*Rosellinia necatrix*、*Phytophthora paracitica* 及 *Sclerotium rolfsii* 等菌株的 genomic DNA，應用聚合酵素連鎖反應技術 (polymerase chain reaction, PCR)，以通用性引子對 ITS1/ITS4 增幅核醣體核酸 (ribosomal DNA, rDNA) 之內轉錄區間 ITS1/5.8S/ITS2 之基因序列，經解序及多重序列比對後，依據 *P. noxius* ITS 區域之相同序列處設計出專一性引子對，正向引子 PN-1F（5’-agtttgcgctcatccatctc-3’)，反向引子 PN-2R（5’-agccgacttacgccagcag-3’)。應用 PN-1F/PN-2R 專一性引子對進行 PCR 反應，對供試之 *P. noxius* 菌株均可增幅出 414 bp 或 422 bp 長度之序列片段；而供試之其它菌株，皆無法增幅出任何片段。此專一性引子對偵測 *P. noxius* 之 DNA 時，靈敏度可達 0.01 ng。以相同之引子對進行 PCR 反應，偵測罹病之龍眼樹及相思樹根部組織，亦可增幅出預期之片段。因此本研究所設計之引子對 PN-1F/PN-2R 能用來快速診斷褐根病與輔助鑑定 *P. noxius*。

防治策略

國外曾有研究報導，土壤根圈中的放線菌(Actinomycetes)[34]和 *Trichoderma* spp.[33]可以抑制 *P. noxius* 菌絲的生長，但沒有進一步的試驗應用，主要防治方法還是以化學藥劑為主；另外亦曾報導以農藥三得芬(tridemorph)、平克座(penconazole)及三泰隆(triadimenol)，可有效抑制 *P. noxius* 菌絲生長[30,35]。另外利用尿素 3000ppm[22]及淹水處理[24]亦能有效防治褐根病。筆者實驗室篩選45種藥劑，選出抑制褐根病菌菌絲生長較佳之藥劑七種，包括滅普寧(Mepronil)、普克利(Propiconazole)、三泰芬(Triadimefon)、撲克拉(Prochloraz)、佈生(TCMTB)、依滅列(Imazalil)、三得芬(Tridemorph)等[9]，並於南投水里地區一發病的葡萄園進行田間試驗，處理方法為，每株 3 年生的葡萄灌注三泰芬＋尿素＋碳酸鈣、撲克拉＋尿素＋碳酸鈣溶液，每種藥劑的用量均為每株 10 g，將藥劑溶水中，沿根圈樹冠灌注，每三個月灌注一次，防治效果顯著(未發表)。綜合上述之生理、生態特性及藥劑試驗，褐根病防治策略如下：1.新墾殖地或重植時，須以挖土機清除所有根系(包括健康者)，避免殘根成為病菌之食物基質，誘發病害。2.發病區處理：(1)罹病嚴重者須掘除，以挖土機將病根完全挖除後燒毀，同時在病株與健株間挖掘深溝以阻隔病原；重植時，土壤須經消毒處理，或以其他無病地區的土壤置換。(2)周圍之健株與罹病輕微者，施用尿素、鈣化合物以增加植株抵抗力。將撲克拉或三泰芬稀釋1000倍後，每三個月灌注根部一次。(3)以割草機除草時，切記勿傷及根冠與樹根，以避免機械將病菌帶入傷口，造成感染。3.廢耕區可進行一個月以上的浸水處理。

結　　論

本省多種果樹，多年來，經常發生生長衰退、落葉、萎凋而終至枯死之現象，病因多而複雜。Sawada 1928 年[10] 與農業要覽 1965 年[8] 曾分別記錄本省龍眼及木本植物被 *F. lamaoensis* （即目前之 *Phellinus lamaoensis* (Murr.) Heim.) 感染罹患立枯病。當時 Sawada 對病原菌並無描述，亦無進

行任何接種試驗。而後，他在 1942 年[11]與 1943 年[12]分別記載一種菊花木屬(*Bauhinia* sp.)植物與咖啡之立枯病，對採集之病菌與子實體有描述，認為病原菌應為 *Fomes noxius* （即目前之 *P. noxius* ），也自認為該菌即為 *F. lamaoensis* 之同種異名（synonym）。但他對以前之病害病原並無更正或說明。*Phellinus noxius* 與 *P. lamaoensis* 並不是同種異名。兩者雖均可引起植物褐根病，均屬 *Phellinus* 屬，但兩者之差異[26,40]為 *P. noxius* 之 tramal setal hyphae 的長度較長，可達 500-600 µm (*P. lamaoensis* 者在 300 µm 以下)；且寬度較寬，可達 12-14 µm (*P. lamaoensis* 者在 9 µm 以下)；hymenial seta 不存在或圓柱形 (*P. lamaoensis* 者為彎曲狀)；有性世代擔孢子為無色透明(*P. lamaoensis* 者在老化後有色素沈澱)。台灣分離之褐根病菌菌株均屬 *P. noxius*，目前 *P. lamaoensis* 並不存在台灣。褐根病在台灣早期即有記錄，但由於鑑定依據主要根據有性世代之形態特性，然而 *P. noxius* 之子實體在田間很少發現，因此最初對病原菌之分類鑑定十分困難。直到 Ann & Ko[14]接受中興大學韓又新教授之建議，利用木屑太空包培養菌株使褐根病菌產生有性世代，才得以完成本菌之鑑定。

引起台灣果樹立枯死亡之木材根部腐朽菌有數種[5]，如白紋羽病菌(*R. necatrix*)、靈芝(*Ganoderma* spp.)及 *Kretzchmaria clavus* (Fr.) Sacc.等，其引起植株之立枯病徵與褐根病相似，但在根部之病徵上則有明顯差異，褐根病菌危害會有褐色菌絲塊及褐色網紋狀之菌絲束，而其它三種則是白色菌絲及黑色線紋，以目前台灣病害發生情形，此三種皆不如褐根病普遍與嚴重，目前 *P. noxius* 已成為本省果樹與樹木根部的最重要病原菌之一。*P. noxius* 之寄主範圍與分佈十分廣泛，分佈於中南美洲、非洲、亞洲、及澳洲等熱帶與亞熱帶地區，寄主作物超過 200 種以上，而且，不同寄主分得之褐根病病原菌可以互相感染其他寄主，尚未發現菌株間有明顯寄主分化之現象[37]，但是菌株間之毒力(virulence)略有強弱差異，尤其菌株對其分離之寄主之毒力似乎較強[16]。

雖然對褐根病之特性已有相當瞭解，但因無抗病品種，目前褐根病之防治，利用浸水一個月可殺死土壤中存活於木材之 *P. noxius*，但是有很多褐根病發生在山坡地無法浸水，因此，還是以藥劑防治為主。*P. noxius* 在自然

界不易產生子實體，可免除擔孢子藉由風傳播之危險性，但必須注意種苗帶菌及土壤帶菌與否。褐根病之防治要領，預防重於治療， 一旦植株出現病徵，根部已有 50 %以上受害，不容易根治病害。因此，發展偵測技術相當重要，在病徵尚未出現之前若能提早偵測出病原，必能達到事半功倍之效果。褐根病在熱帶與亞熱帶地區造成嚴重之病害，而且也是目前台灣中、低海拔果樹及林木主要根部病害之一，但研究褐根病之報告並不多，期望將來有更多研究人員，從事 *P. noxius* 之相關研究，提供較有效率之病害防治策略。

引用文獻

1. 安寶貞、李惠鈴、黃㯖昌.1996. *Phellinus noxius* 引起園藝作物褐根病之新記錄與園藝作物對本菌之抗性檢定. 植病會刊 5:201(摘要)。
2. 安寶貞、李惠鈴、蔡志濃. 1999. *Phellinus noxius* 引起果樹及觀賞植物褐根病之調查. 植病會刊 8:61-66。
3. 安寶貞 柯文雄. 1994. 果樹褐根病之生態與防治研究. 植病會刊 3:69(摘要)。
4. 安寶貞、蔡志濃、王姻婷、謝美如. 1999. 果樹及觀賞植物對 *Phellinus noxius* 之抗感病性檢定. 植病會刊 8:51-60。
5. 安寶貞、蔡志濃、張東柱、王姻婷. 2005. 台灣果樹及觀賞植物立枯型病害之調查與病菌之田間分布. 植病會刊 14: 203-210。
6. 李惠鈴、黃㯖昌. 1991.番荔枝萎凋病之研究初報.植保會刊 33:433(摘要)。
7. 張東柱. 1991. *Phellinus noxius* 引起數種木本植物根腐與頸腐. 植保會刊 33:432(摘要)。
8. 無名氏. 1965. 龍眼立枯病. Page 255. & 茶樹褐根病. Page 141. 農業要覽 作物病蟲害篇 4(1). 台灣省林廳.南投。
9. 蔡志濃、安寶貞、謝文瑞. 2005. 抑制褐根病菌、白紋羽菌及南方靈芝之化學藥劑篩選. 植病會刊 14: 115-124。

10. 澤田兼吉. 1928.樟立枯病菌.臺灣產菌類調查報告 4:86-91。
11. 澤田兼吉. 1942. *Bauhinia* 立枯病菌. 臺灣產菌類調查報告 7:97-98。
12. 澤田兼吉. 1943. 咖啡立枯病菌. 臺灣產菌類調查報告 9:149-150。
13. Almonicar, R. S. 1992. Two types of root rot diseases affecting *Acacia mangium*. Nitrogen Fixing Tree Research Reports 10: 94-95.
14. Ann, P. J., and Ko,W. H. 1992. Decline of longan: association with brown root rot caused by *Phellinus noxius*. Plant pathol. Bull. 1:19-25.
15. Ann, P. J., Chang, T. T., and Ko, W. H. 2002. *Phellinus noxius* brown root rot of fruit and ornamental trees in Taiwan. Plant Dis. 86: 820-826.
16. Ann, P. J., Lee, H. L., and Huang, T.C. 1999. Brown root rot of 10 fruit trees caused by *Phellinus noxius* in Taiwan. Plant Dis. 83:746-750.
17. A rulpragasam, P. V. 1988. Root diseases of tea. Tea Bulletin 8:23-29.
18. Bolland, L. 1984. *Phellinus noxius*: cause of a significant root-rot in Queensland hoop pine plantations. Aust. For. 47: 2-10.
19. Chang, T. T. 1992. Decline of some forest trees associated with borwn root rot caused by *Phellinus noxius*. Plant Pathol. Bull.1:90-95.
20. Chang, T. T. 1995. Decline of nine tree species associated with brown root rot caused by *Phellinus noxius* in Taiwian. Plant Dis. 79:962-965.
21. Chang, T. T. 1996. Survival of *Phellinus noxius* in soil and in the roots of dead host Plant. Phytopathology 86:272-276.
22. Chang, T. T. , and Chang, R. J. 1998. Generation of volatile ammonia from urea fungicidal to *Phellinus noxius* in infested wood in soil under controlled conditions. Plant Pathol. 48:337-334.
23. Chang, T. T., and Chou, W. N. 1999. Two new species of *Phellinus* from Taiwan. Mycol. Res. 103: 50-52.
24. Chang, T. T., and Yang. W. W. 1998. *Phellinus noxius* in Taiwian:Distribution, host plants and the pH and texture of the rhizosphere soils of infected host. Mycol. Res.102:1085-1088.
25. Corner, E. J. H. 1932. The identification of the brown root fungus. Gard.

Bull. Stratis Settl. 5:317-350.

26. Cunningham, G. H. 1965. Polyporaceae in New Zealand. N. Z. Dep. Sci. Ind.Res. Bull. 164:1-304.
27. Dennis, J. J. C. 1992. A new threat from brown root rot of cocoa, caused by *Phellinus noxius*, in Papua New Guinea. Plant Dis. 76:642.
28. Dennis, J. J. C. 1994. First report of pigeon pea root rot caused by *Phellinus noxius* in Papua New Guinea. Plant Dis. 78:316.
29. Geiger, J. P., Rio, B., Nicole, M., and Nandris, D. 1986. Biodegradation of *Hevea brasiliensis* wood by *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius*. Eur. J. For. Pathol. 16:147-159.
30. Gohet, E., Tran Van Cahn., Louanchi, M., and Despreaux, D. 1991. New developments in chemical control of white root disease of *Hevea brasiliensis* in Africa. Crop Prot. 10: 234-238.
31. Govindarajan, T. S. 1988. A review on the incidence of root diseases on coffee and their management. J. Coffee Res. 18: 16-28.
32. Hodges, C. S., and Tenorio, J. A. 1984. Root disease of *Delonix regia* and associated tree species in the Mariana Island caused by *Phellinus noxius*. Plant Dis. 68:334-336.
33. Jacob, C. K., Annajutty, J., and Jayarathnam, K. 1991. Effect of fungal antagonists on *Phellinus noxius* causing brown root disease of *Hevea*. Indian J. Nat. Rubber Res. 4: 142-145.
34. Kothandaraman, R., Kochuthresiamma, J., Mathew, J., and Rajalakshmi, V. K. 1991. Actinomycete population in the rhizosphere of *Hevea* and its inhibitory effect on *Phellinus noxius*. Indian J. Nat. Rubber Res. 4: 150-152.
35. Lim, T. K., Hamm, R. T., and Mohamad, R. B. 1990. Persistency and volatile behaviour of selected chemicals in treated soil against three basidiomycetous root disease pathogens. Tropical Pest Management 36:23-26.

36. Mouli, B. C. 1988. Root diseases of tea and their control. J. Coffee Res. 18:29-37.
37. Nandris, D., Nicole, M., and Geiger, J. P. 1987. Variation in virlence among *Rigidoporus lignosus* and *Phellinus noxius* isolates from West Africa. Fur. J. For. Pathol. 17-271-281.
38. Nandris, D., Nicole, M., and Geiger, J. P. 1988. Root-rot diseases of the rubber tree in the Ivory Coast. 1. Severity. Dynamics and characterization of epidemics. Can. J. For. Res. 18:1248-1254.
39. Neil, P. E. 1988. Root disease (*Phellinus noxius* (corner)G. H. Cunn.) of *Cordia alliodora* in Vanuatu. Commonw. For. Rev. 67:363-372.
40. Pegler, D. N., and Waterston, J. M. 1968. *Phellinus noxius*. C. M. I. Descriptions of pathogenic Fungi and Bacteria. No. 195.

ABSTRACT

Occurrence, diagnosis and control of brown root rot

Tsai, J. N[1,3]., Ann, P. J.[1], and Hsieh, W. H.[2]

[1] Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, COA, Wufeng, Taichung, Taiwan, R.O.C.

[2] Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, aichung, Taiwan

[3] Corresponding author, Email:tsaijn@tari.gov.tw

In recent years, *Phellinus noxius* was found to be widespread and destructive on many tree species throughout Taiwan. The disease causes considerable economic losses to growers each year. *Phellinus* spp. are the members of Basidiomycetes, and they consist 5 groups, 154 species, 67 forms and varieties. The fungus produces a brown colony on potato dextrose agar (PDA) with irregular dark brown lines or patches permeating the culture. Arthrospores and thichocytes, but not clamp connections, are commonly produced in culture. *P. noxius* is a high-temperature organism (10-36℃) with optimal growth near 28-32 ℃. The fungus prefers acidic conditions and is capable of growth at pH 4.5-7.0. *P. noxius* produces thin, hard, uneven basidiocarps similar to those found in nature. They are initially yellowish-brown with a white margin and later become brown and then dark gray. In addition to basidiospores, there are scant hymenial setae and narrow setal hyphae inside the basidiocarp. Fruiting body was not common in nature; It has only been founded on infected longan, litchi, sugar apple , bull oak, flame tree, camphor tree, small-leaved banyan, Indian rubber, and Taiwan melicope. Basidiospore produced on artificial saw dust medium is hyaline, single cell, oval, size 3.8-6.3 X 1.5-5.0 μm. Disease symptom of brown root rot were classed into rapid decline and slow decline. Root infected with *P. noxius* initially exhibits a brown discoloration of the wood just beneath the bark. In advanced stages of decay, the wood develops a soft, stringy white rot with a conspicuous network of brown zone lines. The outer bark surface appears rough because it is covered with a

layer of adhering soil particles and brown fungal mycelia. The inner bark is covered with white to brownish mycelial mat. *P. noxius* has a wide host range; it has been reported on more than 200 plant species in the world and over 130 plant species in Taiwan containing many fruit tree, ornamental tree and forest tree. *P. noxius* causes decline and death of ornamental trees planted on campuses, sightseeing places, and parks, and around private and public buildings. Nucleotide sequences of ITS1, 5.8S and ITS2 of 80 strains of *Phellinus noxius* obtained from 33 tree species at different geographic locations in Taiwan from 1991 to 2006 were analyzed. These strains were divided into two ITS types based on the nucleotide length, type L with 614 bp and types S with 606 bp. Majority of the strains belonged to type L. Both type L and type S were present at most counties of Taiwan. In order to develop a pair of specific primers for rapid and accurate diagnosis of the disease associated with the pathogen in the fields, the ribosomal DNA (rDNA) sequences in internal transcript spacer (ITS, including ITS1/5.8S/ITS2) regions from *P. noxius* and several other soil-borne fungi were studied. Based on the ITS sequences, a set of primers PN-1F/PN-2R was designed. The forward primer PN-1F sequence is “5’-agtttgcgctcatccatctc-3’ ” and the reverse primer PN-2R is “5’-agccgacttacgccagcag-3’ ”. Using PN-1F/PN-2R primers for PCR amplification under a setup condition and the fungal genomic DNA as templates, a distinct 414 bp or 422 bp fragment were amplified form *P. noxius,* whereas no PCR products can be amplified from other soil-borne fungi tested. The PCR could amplify the fragments recognizable within 3-4 hr when concentration of purified DNA was higher or equal to 0.01 ng. Meanwhile, similar amplified fragments were obtained when the diseased root tissues of *Dimocarpus longana* and *Acasia confusa* from *P. noxius* infested fields were used as templates. Results presented here suggest that the primer pairs PN-1F/PN-2R can be efficiency in auxiliary identifying *P. noxius* and accurately and rapidly detecting disease caused by the pathogen in the field. In order to search of effective control measures, potato dextrose agar amended with individual chemical was used to evaluate the effects of different concentrations of synthetic chemicals on suppression of *P. noxius*. Among the 45 chemicals tested against *P. noxius*, 25% propiconazole EC was most

effective, completely inhibiting the mycelial growth at the active ingredient dosage of 10 ppm. Bordeaux mixtures were also very effective in inhibiting mycelial growth. Another study was conducted to determine survival of *P. noxius* in infected stems of loquat buried in soil amended with fungicides, fertilizers, or by flooding. Results showed that treatment of soil with urea at 2.0 g/L soil or flooding of soil for 10 days completely eliminated the pathogen in the stems. A field trial was carried out on 3-5 year-old grapes in a field naturally infested with *P. noxius* in Shuili, Nantou. Results showed that soil drenching every 3 months with the solution containing 10 g 5% triadimefon+10 g urea+10 g $CaCO_3$ in 1 L of water was the most effective treatment with no infected grapevines developed in all the 60 plants after treating for 2.5 years. In contrast, 6 of 42 (14.3%) tested plants in the untreated control were killed by *P. noxius* in 2.5 years.

Key words：*Phellinus noxius*, brown root rot, phylogenetic assay, disease control

洋香瓜黑點根腐病的發生與嫁接防治

林益昇[1]、蘇俊峯[2,3]

[1] 亞洲大學生物科技系

[2] 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組

[3] 聯絡作者，電子郵件信箱：forte9135101@tari.gov.tw

摘　　要

Monosporascus cannonballus 在田間侵害洋香瓜引起根腐，大部份罹病植株於採收前二星期產生急速萎凋（sudden wilt）的病徵。在溫室內以土壤試管法接種法進行 *M. cannonballus* 的接種試驗，結果顯示供試的 10 種瓜類作物，包括洋香瓜、香瓜、越瓜、胡瓜、冬瓜、南瓜、西瓜、蒲瓜、絲瓜與苦瓜等，其根圈附近，皆有其子囊孢子發芽及菌絲侵入根表皮的情形。田間調查得知洋香瓜黑點根腐病菌在台灣的寄主植物有：洋香瓜、香瓜、越瓜、胡瓜、蒲瓜（作西瓜根砧）和冬瓜等。除了洋香瓜發病嚴重外，其他作物黑點根腐病僅局限在彰化縣芳苑鄉小面積或溫室內發生。另外，本病原菌僅可由罹病根組織分離得到，自同一罹病株根腐指數為 0-4 各級的部位，所得病原菌分離率分別為 69、82、73、40 與 9%。利用舌狀根靠接法所製作的洋香瓜嫁接株，顯示以南瓜 1913 當根砧之嫁接株表現優良而穩定的成效。雖然南瓜根砧會被 *M. cannonballus* 所感染，但是根砧之根數佔整個嫁接植株根系的 54%，且其根腐指數較低。在採收期嫁接株地上部雖表現暫時萎凋的特性，但尚有符合商品價值的洋香瓜果實可供收穫。

關鍵詞：洋香瓜黑點根腐病、寄主範圍、*Monosporascus cannonballus*、舌狀根靠接法、嫁接

緒　　言

洋香瓜黑點根腐病（root rot/vine decline of muskmelon）是洋香瓜（*Cucumis melo* L.）的重要病害，由子囊真菌 *Monosporascus cannonballus* Pollack & Uecker 所引起[21]，主要發生在熱帶與亞熱帶地區[13]，台灣則於1994年由蔡與童兩氏[29]首先記錄本病害之發生。目前田間仍未有抵抗黑點根腐病的洋香瓜栽培種[3]，亦未見有效藥劑推薦使用於本病害之防治[4]。雖然，以色列農民於洋香瓜植前利用溴化甲烷進行土壤燻蒸，可有效降低本病害的發生[3]，而溴化甲烷陸續被世界各國禁止使用[22]。在台灣，依2003年行政院環境保護署所頒佈的溴化甲烷管理辦法，溴化甲烷也僅可用於進、出口檢疫。因此，洋香瓜黑點根腐病勢將繼續危害世界各地的洋香瓜產業，一般情形此病可造成洋香瓜10~25%的產量損失，而有些個別瓜田的損失則達100%[13]。已有文獻報導，將洋香瓜嫁接到耐病的瓜類作物根砧上，或可以在田間防治本病害[3]，然而卻無有效接種方法可利用於篩選抗/耐病根砧品種。因此本篇報導將根據*M. cannonballus*的田間寄主範圍及其子囊孢子在不同葫蘆科作物根部發芽並侵入植株根部的行為，篩選可用的嫁接根砧，並評估嫁接後洋香瓜的鮮食品質，發展可應用於田間的嫁接防治方法。

洋香瓜黑點根腐病的發生與病原菌分離

根據調查[11]洋香瓜（秋香）植株定（移）植於本田後 7 星期內，在開花、結果之前，黑點根腐病地上部病徵並不明顯，不易觀察，且萎凋率皆為 0；待植株開花結果後，地上部才會出現生長停滯、葉片黃化與壞疽等病徵，但是瓜蔓與葉柄並不會表現病徵，且移植後 9 星期之內，萎凋率仍低於 20%；然而，到採收前 2 星期，整園出現急速性萎凋（sudden wilt）病徵，致使果實暴露在太陽底下，嚴重影響果實品質而無法成熟。個別田的萎凋率常高於 80%，所收穫之果實不具有商品價值。而洋香瓜黑點根腐病在地下部之初期病徵，則表現於植株移植至本田 5 星期之後，此時地上部尚無病徵的洋香瓜植株，根系有 1-2 條的一級與二級側根，出現黑點根腐病「紅

色病斑」（根腐指數 1 級），利用組織分離法可由這些病徵部位，分離得到黑點根腐病菌。稍後，這些病斑會擴大融合造成根腐，使一級與二級側根由主根上脫落。此時，洋香瓜植株或可新長出側根，但通常表現根系「缺少側根與根毛」的病徵。在移植 9 星期之後，地上部已有萎凋病徵的洋香瓜植株主根上，可觀察到零星的「褐色凹陷的壞疽斑」（根腐指數 2 級）。到採收前 2 星期，主根上散生許多壞疽斑，並癒合形成根腐（根腐指數 3 級）。待洋香瓜採收後，植株之根腐益趨嚴重，甚至在直徑較小的根上，有一些黑色、圓形、半埋生於根部皮層的子囊殼形成（根腐指數 4 級）。若是罹病根持續留在田間土壤環境中（土壤含水量為 7-9%，土表下方 10 cm 溫度為 25-26℃）一個月，則根部會有大量的子囊殼產生，但下胚軸、莖部與葉片則否。子囊殼內有許多子囊，每一子囊內僅含有一個圓形的子囊孢子，子囊孢子 6 層壁，成熟的子囊孢子黑色，直徑介於 40-50 μm 之間，平均為 46 μm，符合黑點根腐病菌的特徵[21]。

洋香瓜罹病株組織片段在 1.5% WA 培養基上培養兩天，即會長出稀疏狀的黑點根腐病菌菌絲。菌絲有隔膜、分支不成直角。切取菌絲尖端於 PDA 培養基上純培養，初期其菌落白色、棉花狀、具氣生菌絲、生長速率為 6.4 mm/day。約純培養 7 天後待菌絲長滿培養基，培養基背面開始有淺褐色至黑色的色素累積，培養基內氣生菌絲開始減少。純培養一個月後，培養基內已無氣生菌絲，大量的黑色子囊殼會在培養基表面形成或埋生於培養基內。在洋香瓜採收後期，自田間採集發生黑點根腐病萎凋病徵的罹病株 59 棵，由其不同根腐指數的根組織與下胚軸分離病原菌，結果僅由根組織分離得到病原菌，其中由根腐指數 0~4 級的根組織分別得到 69、82、73、40 與 9%的分離率（表一）。由此可知，該些病原菌分離株來自於纏聚罹病組織的菌絲，因子囊孢子在一般實驗室培養基不會發芽。並且該病原菌的感染僅侷限於根部，並不會沿維管素侵入、感染植株地上部。而由罹病組織罹病程度增加，病原菌分離率卻下降這一點看來，菌絲或許不具存活功能。

表一、由黑點根腐病罹病株之不同根腐指數罹病部位分離黑點根腐病菌[1]
Table 1. The isolation rate of *Monosporascus cannonballus* from tissues with different root rot index[1]

Tissue	Root rot index	Isolation rate (%)
Root	0	69
	1	82
	2	73
	3	40
	4	9
Hypocotyl	0	0

[1] Fifty-nine diseased plants of muskmelon affected with root rot/vine decline were collected from fields and assayed for root rot index on a scale of 0-4: 0= Healthy; 1=Red lesion; 2=Necrotic spot; 3=Root rot; and 4= Perithecia formed on root surface.

洋香瓜黑點根腐病的病害管理策略

在本病害的病害管理上，迄今世界各地對黑點根腐病仍束手無策，僅有報導指出在以色列農民普遍使用溴化甲烷做植前的土壤燻蒸（methyl bromide fumigation），能有效的降低本病害的發生 (30)。但是溴化甲烷對人體與環境皆有毒害，已被世界各國分階段的禁止使用 (22)。在台灣，依 2003 年行政院環境保護署所頒佈的溴化甲烷管理辦法，溴化甲烷僅可用於進、出口檢疫，因此研發其他符合環境評估的病害管理替代方案，變得有其急迫性。抗病育種（breeding for resistance）是可行的替代方案之一，但是洋香瓜種類繁多且雜，加上溫室接種技術尚未健全，使得篩選抗病品種的工作困難進行 (3)，例如洋香瓜 Ananas-type 與 Honeydew 栽種在美國時，對黑點根腐病菌表現耐病性 (15, 33)；但是 Ananas-type 栽種在以色列時，則對黑點根腐病菌表現感病性 (3)。輪作（crop rotation）亦是農民常用的方法之一，尤其在台灣的洋香瓜田常與水稻輪作，但是在黑點根腐病的防治上，效果不明顯。在以色列曾有利用太陽能搭配築高畦與塑膠布的使用，使土

溫增加至 60℃，可降低土壤中黑點根腐病菌的密度；或在採收期利用滴灌的方式，每天供給植株充足的水分，減少黑點根腐病罹病株急速萎凋病徵的發生[3]，但這些技術仍在開發階段，且不適於台灣的氣候與栽培方式。化學藥劑（fungicide）的施用是農民最能接受的防治方法，雖然在溫室試驗中 fluazinam 與 kresoxim-methyl 對黑點根腐病具有防治效果，但施用於田間效果則不穩定[4]，目前仍未有有效的化學藥劑推薦於田間施用。亦有學者嘗試以 *Trichoderma virens* 進行生物防治[34]；或採取疏果方式減少地上部萎凋病徵[18]，但皆仍在試驗階段。另外，Cohen 等人[3]認為葫蘆科作物品種間具有嫁接親和性（rootstock-scion compatibility），或可考慮將洋香瓜嫁接到耐/抗病的瓜類作物根砧上，以達到防治效果。若要進行嫁接防治，首先必須由黑點根腐病的寄主範圍著手，以篩選可用的根砧。

洋香瓜黑點根腐病的寄主範圍

雖然黑點根腐病菌在一般實驗室用培養基上不會發芽，然而 Stanghellini 等人[25]研發土壤試管法（soil tube method, STM），應用本方法將洋香瓜秋香種子播種在試管內之人工混菌土中，接種後第 3 天即可在根圈附近觀察到黑點根腐病菌子囊孢子發芽並侵入植株根表部（圖一），平均每個根系有 6 個已發芽的子囊孢子。播種後第 12 天，根圈附近已發芽的子囊孢子數達到高峰，每個根系有 71 個，爾後，根圈附近已發芽的子囊孢子數逐漸下降至每個根系約有 20-50 個。取每個根系發芽孢子數之對數對接種後之天數作圖並經迴歸分析，得到 $y=0.0012x^3-0.0643x^2+1.0266x-1.1802$ 的曲線（$R^2=0.9144$），該曲線在接種後第 12 天有最大值（圖二）。因此，往後試驗的觀察天數訂為 12 天。利用土壤試管法測試 *M. cannonballus* 的寄主範圍，所選用的葫蘆科植株包括洋香瓜（秋香、蜜世界、狀元、新世紀）、香瓜（*C. melo* var. *makuwa*）（銀輝）、冬瓜（*Benincasa hispida* Thunb.）（農友細長 1 號、小惠、小青）、南瓜（*Cucurbita pepo* L.）（壯士、鳳凰）、西瓜（*Citrullus lanatus* Matsum.）（富寶 2 號、勇士）、絲瓜（*Luffa aegyptiaca* Mill.）（美菱、東光）、蒲瓜（*Lagenaria siceraria* Standi.）（永樂、永秀）、胡瓜

（*Cucumis sativis* L.）（萬吉）、苦瓜（*Momordica charantia* L.）（農友新三號）與越瓜（*C. melo* var. *conomon*）（銀華、農友白皮）等 10 種瓜類作物，共 20 個栽培種。黑點根腐病菌子囊孢子皆會在這些植株根部發芽並侵入根部組織，每個根系觀察到 5-91 個已發芽的子囊孢子，其中又以洋香瓜（秋香、蜜世界、狀元、新世紀）、越瓜（銀華）、蒲瓜（永樂）與胡瓜（萬吉）為最多，每個根系分別有 77、68、66、64、91、66 與 55 個已發芽侵入根系的子囊孢子（表二）。將已被侵入的根部組織片段，利用組織分離法分離，則皆可分離得到病原菌。然而，在非葫蘆科的供試作物包括蕃茄（*Lycopersicon esculentum* Mill.）（聖女）、蕹菜（*Ipomoea aquatica* Forssk.）（桃園 1 號）、茼蒿（*Chrysanthemum coronarium* L.）（大葉種）、長豇豆（*Vigna unguiculata* Walp.）（麗人）及不結球白菜（*Brassica campestris* L.）（青梗白菜）等植株根部，則無法觀察到已發芽的子囊孢子，也無法分離得到病原菌。由此可知，黑點根腐病菌僅會感染葫蘆科作物。但是子囊孢子會侵入感染葫蘆科植株根部，是否就代表田間會發病嗎？

圖一、黑點根腐病菌子囊孢子發芽後侵入洋香瓜根部。

Fig. 1. The germination of *Monosporascus cannonballus* ascospore and the germ tubes or hyphae attached to muskmelon plant root. The observation was made 12 days after inoculation by the soil tube method, employing an initial ascospore density of 3 x 10^3 ascospores/g soil. Bar= 50 µm.

表二、供試作物對黑點根腐病菌子囊孢子發芽與侵入根部的影響 [1]

Table 2. Effect of host plants on the germination of *Monosporascus cannonballus* ascospores in the root systems[1]

Plant	Cultivar	Geminated ascospores/root system
Cucurbit		
Muskmelon (*Cucumis melo*)	Autumn Favor (秋香)	77 a[2]
	Honey World (蜜世界)	68 ab
	Golden Prize (狀元)	66 ab
	New Century (新世紀)	64 ab
Japanese melon (*C. melo* var. *makuwa*)	Silver Light (銀輝)	48 bc
Oriental pickling melon (*C. melo* var. *conomon*)	Silver Charm (銀華)	91 a
	White Skin (農友白皮)	22 bc
Bottle gourd (*Lagenaria siceraria*)	Ever Happiness (永樂)	66 ab
	Ever Rich (永秀)	39 bc
Cucumber (*Cucumis sativus*)	Vantage (萬吉)	55 ab
Watermelon (*Citrullus lanatus*)	Empire No. 2 (富寶 2 號)	19 bc
	Knight (勇士)	23 bc
Squash (*Cucurbita moschata*)	Strong Man (壯士)	18 bc
	Phoenix (鳳凰)	33 bc
Bitter gourd (*Momordica charantia*)	K. Y. No. 3 (農友新三號)	21 bc
Wax gourd (*Benincasa hispida*)	K. Y. Trim (農友細長 1 號)	9 c
	Benefit (小惠)	5 c
	Christine (小青)	3 c
Loofah (*Luffa cylindrica*)	Miriam (美菱)	7 c
	Cylinder (東光)	6 c
Non-cucurbit		
Water spinach (*Ipomoea aquatica*)	TY No. 1 (桃園 1 號)	0 d
Non-heading mustard (*Brassica campestris*)	Ching-Chiang (青梗白菜)	0 d
Tomato (*Lycopersicon esculentum*)	Santa (聖女)	0 d
Garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*)	Big Leaf (大葉種)	0 d
Asparagus bean (*Vigna unguiculata*)	Li-Ren (麗人)	0 d

1 The ascospore germination was evaluated by soil tube method （Stanghellini et al., 1996） in which the inoculum source soil had an initial ascospore density of 3 x 10^3 ascospores/g soil. One single seed was dropped into each tube. Five tubes were assayed for each plant 12 days after inoculation.

2 Values followed by the same letter in the column are not significantly different at p> 0.05 according to LSD Test.

根據文獻記載本病原菌之田間寄主，除了洋香瓜[21]之外，西瓜[14]及以蒲瓜作為根砧用於防治西瓜萎凋病的西瓜嫁接株[31]，亦受此菌危害。而疑似黑點根腐病菌的菌株（*Monosporascus* spp.）亦可由一些田間非瓜類植株根部分離得到，包括：土牛膝（*Achyranthes aspera* L.）[7]、苜蓿（*Medicago sativa* L.）[21]、紅三葉草（*Trifolium pratense* L.）[23]與小麥（*Triticum aestivum* L.）[7]等。Mertely 等人[15]曾在溫室以人工混菌土進行接種試驗測試其寄主範圍，指出 *M. cannonballus* 會感染洋香瓜、西瓜、蒲瓜、胡瓜、南瓜與絲瓜等根部，並引起根腐。因此，他們推測瓜類作物可能都是本病原菌的田間寄主。但是他們使用消毒過的栽培介質（steam-pasteurized sand & perlite）製作人工病土的接種方法，評估本病原菌在田間的真正寄主範圍，似不甚適宜。

筆者於 2000 至 2006 年在彰化縣芳苑鄉、台南縣東山鄉、安南區、七股鄉、佳里鎮、西港鄉、雲林縣崙背鄉與宜蘭縣壯圍鄉等地進行洋香瓜黑點根腐病調查的結果顯示，目前市面上商業栽培用的洋香瓜品種，包括秋香、天蜜、香華、蜜世界、七股香、紅寶石、紅寶石 2 號、藍寶石、藍寶石 2 號、新世紀與狀元等，對黑點根腐病菌皆表現感病性，在果實採收前 2 星期，洋香瓜會出現急速萎凋的病徵，有些個別田的黑點根腐病萎凋率甚至高達 98%；亦有些栽培田的洋香瓜植株僅出現葉片黃化與萎凋（yellowing and wilt）的病徵，萎凋率則低於 50%；採收期過後，調查田間殘留的洋香瓜植株根部，則皆會佈滿黑點根腐病菌的子囊殼（perithecium）（表三）。

另外，以其他瓜類作物包括香瓜、越瓜、冬瓜、南瓜、西瓜、絲瓜、蒲瓜、胡瓜、苦瓜與七葉膽（*Gynostemma pentaphyllum* Makino）等為對象進行田間調查，結果僅在少數地區的香瓜、越瓜、嫁接西瓜（以蒲瓜當根砧）、冬瓜與胡瓜栽培種上，觀察到黑點根腐病零星發生。在台南縣白河鎮、嘉義縣水上鄉、台中縣大里市、彰化縣芳苑鄉、宜蘭縣壯圍鄉與雲林縣北港鎮等地所栽種的香瓜（銀輝）上亦有發現黑點根腐病，然而這些瓜田中萎凋率差異性很大，介於 19-91%之間，其中有的栽培田僅零星出現植株萎凋，對於果實產量影響有限，但是亦有的栽培田出現急速萎凋，甚至有急速青枯的病徵，致使果實無收穫。不論地上部病徵為何，罹病株根部皆會

有黑點根腐病菌的子囊殼產生（表三）。

過去彰化縣芳苑鄉因嚴重發生洋香瓜黑點根腐病，農民近年大多轉作水稻（*Oryza sativa* L.）、花生（*Arachis hypogaea* L.）、蘆筍（*Asparagus officinalis* L.）、十字花科蔬菜或其他葫蘆科作物包括冬瓜、嫁接西瓜（蒲瓜砧）與越瓜等，而轉作之越瓜、嫁接西瓜（蒲瓜砧）與冬瓜，亦有發生黑點根腐病者，在罹病株根部產生黑點根腐病菌的子囊殼。而地上部病徵則以越瓜與嫁接西瓜（蒲瓜砧）較為嚴重，罹病株地上部會出現萎凋，萎凋率介於 13-74%之間（表三），亦有整園急速萎凋者，嚴重影響果實產量。雖然，冬瓜黑點根腐病的地上部萎凋率於中午蒸散作用旺盛時高達 79%，但是皆屬於暫時性萎凋（temporary wilt），傍晚時，暫時萎凋的冬瓜植株又會恢復生長，且田間未有植株死亡的情形，更不會影響冬瓜果實的生產。此種因黑點根腐病產生暫時性萎凋的病徵，亦出現在嘉義縣新港鄉與雲林縣北港鎮等地以溫室栽種胡瓜（中市 501 與日本品種味壹角）的園區中，雖然暫時萎凋率分別達 56 與 57%（表三），農民仍可繼續採收胡瓜果實。

進一步，將 10 種葫蘆科作物定植於台南縣佳里鎮一處洋香瓜栽培田，利用網篩法（sieve method）[24] 測得土壤中含有 4-5 ascospores/g soil。每兩星期逢機挖取每種瓜類 2 植株，於實驗室分離黑點根腐病菌。結果定植後 4 星期之內，無法由此 10 種供試的植株根部分離得到黑點根腐病菌。定植後第 6 星期，首先由洋香瓜 0823 與越瓜 1903 根部可分離得到黑點根腐病菌；接著在定植後第 8 星期，由胡瓜 2220 根部，與定植後第 10 星期，由香瓜 1912、冬瓜 1202、南瓜 1913 與西瓜 1100 根部亦可分離得到黑點根腐病菌，最後在定植後第 12 星期，由蒲瓜 0508 根部可分離得到黑點根腐病菌。然而試驗的 12 星期期間，無法由絲瓜 0312 與苦瓜 1403 根部分離得到黑點根腐病菌（表四）。

由以上結果顯示：雖然在人工環境下黑點根腐病菌可侵入眾多供試之瓜類作物根部，但這些瓜類作物在自然環境下並不一定發病。另外，從多種葫蘆科作物田間黑點根腐病罹病株表現暫時萎凋，並且不會影響果實品質這一點看來，或可以其他葫蘆科作物為根砧，於田間防治洋香瓜黑點根腐病。因為洋香瓜黑點根腐病主要造成植株於採收前兩星期產生急速萎凋的病

徵，而洋香瓜果實屬於更年性果實（climacteric fruit）[1]，果實成熟必須於活體植株上完成（亦即植株死亡之後，其果實不會後熟）。因此，洋香瓜嫁接株即時表現暫時萎凋的病徵，該嫁接株所產之果實，應仍具有商品價值。繼此，本研究又於罹病田中定植 10 種葫蘆科作物，結果定植後第 6 星期，即可由洋香瓜與越瓜根部分離得到黑點根腐病菌，而由胡瓜、香瓜、冬瓜、南瓜、西瓜與蒲瓜根部亦可於往後幾星期內陸續分離得到黑點根腐病菌。然而試驗 12 星期期間，無法由絲瓜與苦瓜根部分離得到黑點根腐病菌（表四）。此結果顯示多種瓜類作物或許適合當作抗/耐病根砧之用。

洋香瓜黑點根腐病的嫁接防治

嫁接（grafting）已普遍應用在防治多種瓜類作物的土壤傳播性病害。所謂嫁接乃是將兩個或以上的獨立植株個體，分別切取部分組織部位，將其在維管束組織部位組合，當該處癒合後成為一單獨的植株個體，即為嫁接株。而根砧與接穗的種、屬越接近者，嫁接成活率也越高，如絲瓜與絲瓜共砧，嫁接成活率定高於絲瓜砧頂劈嫁接苦瓜[10]。此外，嫁接法亦會影響嫁接成活率，如舌狀靠接的嫁接成活率必定高於頂劈嫁接法。因此不同的根砧與嫁接法的選用，則需視病害防治的目的而定[10]。已有文獻指出以蒲瓜與南瓜當根砧，利用頂劈嫁接法製作嫁接苗，該些洋香瓜嫁接株在田間可以延後與減緩黑點根腐病的發生至採收後期[3, 5, 31]，然而果實鮮食時有某種不屬於洋香瓜的怪味道，品質不佳[3]。Traka-Mavrona 等人[28]在不考慮洋香瓜黑點根腐病的防治效果前提下，利用舌狀靠接法將多種洋香瓜栽培品種嫁接於多種南瓜栽培品種根砧上，發現各種接穗/根砧組合之嫁接苗與無嫁接之洋香瓜實生苗，在產量（Kg/palnt）、果實大小（Kg/fruit）與果實形狀差異不顯著（$p< 0.05$），但是鮮實的口感（taste）與果實的質地（texture）會因不同接穗/根砧組合而表現不同，有些與實生苗所產之果實無差異（$p< 0.05$）。

表三、台灣瓜類作物黑點根腐病的田間病害調查

Table 3. The field surveys of Monosporascus root rot/vine decline on cucurbit plants in Taiwan

Cucurbit	Cultivar	Field location	Year of survey	Main symptoms	Wilt rate (%)
Muskmelon (*Cucumis melon*)	Autumn Favor, Tianmi, Siianghua	Fangyuan	2000-02	SW, PPR[1]	56-85
	Honey world	Tungshan, Annan	2001-04	YW, SW, PPR	19-98
	Chigu favor, Red jewel No. 2, Blue jewel No. 2	Chigu, Jiali	2005-06	YW, SW, PPR	20-90
	Red jewel	Annan, Lunbei	2001-02	SW, PPR	89-91
	Blue jewel, Golden prize	Zhuangwei	2004	SW, PPR	83-93
	New century	Zhuangwei, Xigang	2004, 2006	SW, PPR	88-95
Japanese melon (*C. melon* var. *makuwa*)	Silver light	Baihe, Shuishang, Dali, Fangyuan, Zhuangwei, Beigang	2004-05	W, SW, SGD, PPR	19-91
Oriental pickling melon (*C. melon* var. *conomon*)	*Cucumis* spp.	Fangyuan	2002, 2004	W, SW, PPR	30, 56
Grafting watermelon (*Citrullus lanatus*) (bottle gourd as rootstock)	*Citrullus* spp.	Fangyuan	2001, 2004	W, SW, PPR	13, 74
Wax gourd (*Benincasa hispida*)	*Benincasa* spp.	Fangyuan	2003	TW, PPR	79
Cucumber (*Cucumis sativus*)	Taichung 501, i-yi-jiao	Singang, Beigang,	2005	TW, PPR	53, 56

1 SW= Sudden wilt; PPR= Perithecium production on roots; YW= Yellowing and wilt; W= wilt; SGD=Sudden green death; TW= Temporary wilt.

表四、在田間病圃中測試洋香瓜黑點根腐病菌對 10 種葫蘆科作物的病原性[1]
Table 4. Pathogenicity test of *Monosporascus cannonballus* on 10 cucurbit species in field study[1]

Plant	Cultivar	Pathogen isolation					
		Weeks after transplanting					
		2	4	6	8	10	12
Cucumis melo var. *inodorus*	Muskmelon 0823	-[2]	-	+	+	+	+
C. melo var. *makuwa*	Japanese cantaloupe 1912	-	-	-	-	+	+
C. melo var. *conomon*	Oriental pickling melon 1903	-	-	+	+	+	+
Cucumis sativus	Cucumber 2220	-	-	-	+	+	+
Benincasa hispida	Wax gourd 1202	-	-	-	-	+	+
Cucurbita moschata	Squash 1913	-	-	-	-	+	-
Citrullus lanatus	Watermelon 1100	-	-	-	-	+	+
Lagenaria siceraria	Bottle gourd 0508	-	-	-	-	-	+
Luffa cylindrical	Loofah 0312	-	-	-	-	-	-
Momordica charantia	Bitter gourd 1403	-	-	-	-	-	-

1 The plants were transplanted into field at Dec. 12, 2006 at Jiali, Tainan. And each two weeks, two plant root systems of each cucurbit were collected to isolate the pathogen of *Monosporascus cannonballus* in laboratory.

2 “-”= the pathogen of *M. cannonballus* could not be isolated in media, but “+”= it could.

過去我們也曾選用 6 種葫蘆科作物當根砧，包括洋香瓜、蒲瓜、南瓜、冬瓜、絲瓜與西瓜等，嘗試 4 種嫁接法包括 1：1 頂劈嫁接法、割裂靠接法（cleft inarching grafting）、割裂根靠接法（cleft root inarching grafting）與舌狀根靠接法等，在田間評估嫁接技術防治洋香瓜黑點根腐病的可行性（10, 27），結果發現以蒲瓜、冬瓜與南瓜當根砧之嫁接株，表現較好的黑點根腐病防治效果；以冬瓜與南瓜當根砧之嫁接株，其所產的洋香瓜果實表現較佳的鮮食品質；採用舌狀根靠接法所製作之嫁接株，在嫁接苗的培育與管理，以及所產洋香瓜果實的鮮食品質，皆優於其他供試的嫁接法。因此選

用冬瓜與南瓜當根砧製作舌狀根靠接苗，供田間防治試驗使用[26]。

在台南縣七股鄉試驗田 I 與 II 中，該田 2004 至 2005 年期洋香瓜（蜜世界）黑點根腐病萎凋率分別為 64 與 93%，利用網篩法亦可測得其土壤中含有 4-5 ascospores/g soil。於 2005 年 11 月選用洋香瓜藍寶石 2 號當接穗，冬瓜 1202 與南瓜 1913 當根砧，於穴盤中製作舌狀根靠接苗。在試驗田 I 中，供試的嫁接苗與實生苗初期生長良好，定植後 8 星期內皆無萎凋發生。定植 9 星期以後，供試植株地上部開始表現葉片黃化與萎凋，地下部則出現根腐指數 1 的病徵，由這些病斑可分離得到黑點根腐病菌。定植第 11 星期以後，實生苗與以冬瓜 1202 為根砧的嫁接株，萎凋率達 76% 以上，洋香瓜無收穫或所產洋香瓜品質不佳。以南瓜 1913 為根砧的嫁接株在田間表現暫時性萎凋的特性，定植第 11 星期以後，萎凋率由 23%下降為 2%，並與對照組差異顯著（$p< 0.05$）（表五），且仍有符合商品價值的洋香瓜採收。待果實採收後，計算實生苗與嫁接株的根數，實生苗只有 6.8/plant，與以冬瓜 1202 與南瓜 1913 為根砧兩種嫁接株的根數 8.1 與 8.2/plant，皆差異顯著（$p< 0.05$）。其中，嫁接株的根砧與接穗根數所佔百分比，以冬瓜 1202 當根砧的嫁接株為 21%：79%，以南瓜 1913 當根砧的嫁接株為 54%：46%。不論根砧或接穗根部，皆有程度不一的根腐，其中實生苗與以冬瓜 1202 為根砧嫁接株的接穗根系，根腐指數皆為 2.6，但是以南瓜 1913 為根砧嫁接株的接穗根系，根腐指數只有 1.2。另外，冬瓜 1202 與南瓜 1913 根砧根系的根腐指數，分別為 3.8 與 1.1，兩者呈差異顯著（$p< 0.05$）（表五）。在試驗田 II 中，定植 9 星期供試植株開始發生黑點根腐病，定植第 11 星期以後，實生苗與以冬瓜 1202 當根砧的嫁接株萎凋率達 80%以上，實生苗甚至死亡，無洋香瓜果實可採收。以南瓜 1913 為根砧的嫁接株在田間表現暫時萎凋的特性，定植後第 11 星期至採收期，萎凋率由 67%下降至 37%（表五）。待果實採收後，計算實生苗與嫁接株的根數，實生苗為 6.7/plant，以冬瓜與南瓜當根砧的嫁接株則分別為 8 與 7.9/plant。分析嫁接株的根砧與接穗根數所佔百分比，以冬瓜 1202 當根砧的嫁接株分別為 20%與 80%，以南瓜 1913 當根砧的嫁接株則分別為 54%與 46%。實生苗與以冬瓜 1202 為根砧嫁接株的接穗根系，根腐指數分別為 2.8 與 2.7，而以南瓜 1913 當根砧的嫁接株的

接穗根系只有 1.7。此外，根砧根系的根腐指數，冬瓜 1202 與南瓜 1913 分別為 3.8 與 1.6，兩者呈差異顯著（$p < 0.05$）（表五）。

2007 年 8 月又在台南縣西港鄉選定一處洋香瓜栽培田，用洋香瓜藍寶石 1 號當接穗，洋香瓜 0596 與南瓜 1913 當根砧，利用舌狀根靠接法製作嫁接苗，於 8 月 27 日將嫁接株定植於該田。植株初期生長良好，定植後 7 星期之內皆無黑點根腐病地上部病徵的發生。然而定植後第 8 星期，供試植株皆開始有零星出現黑點根腐病的地上部病徵，罹病株表現葉片黃化、萎凋與果實曝露。無嫁接之實生株、以洋香瓜 0596 與南瓜 1913 當根砧之嫁接株，地上部萎凋率分別為 7、15 與 1%。此時田間進行疏果，使每棵植株上僅留 1 或 2 顆洋香瓜果實。植株定植後第 9 星期，田間發生黃葉、萎凋的罹病株持續增加，到定植後第 10 星期，3 種處理的植株萎凋率分別達 43、57 與 19%，仍以南瓜 1913 當根砧之嫁接株，萎凋率為最低（表六）。植株定植後第 11 星期，分兩次（11 月 6 與 9 日）採收具市場價值的洋香瓜，第一次採收時，以無嫁接之實生株的產量較多，每 40 棵植株採收 31 顆洋香瓜，共可採收 50.8 kg/40 plants；而以南瓜 1913 當根砧之嫁接株的產量較少，每 40 棵植株採收 22 顆洋香瓜，共可採收 36.1 kg/40 plants。第二次採收時，則以南瓜 1913 當根砧之嫁接株的產量較多，每 40 棵植株採收 44 顆洋香瓜，共可採收 64.2 kg/40 plants；而無嫁接之實生株的產量較少，每 40 棵植株採收 19 顆洋香瓜，共可採收 31.2 kg/40 plants。綜合兩次採收的結果，以南瓜 1913 當根砧之嫁接苗的產量最多，每 40 棵植株可採收 100.3 kg/40 plants；而以洋香瓜 0596 當根砧之嫁接株的產量最少，每 40 棵植株可採收 70.8 kg/40 plants（表七）。待果實採收後，計算實生苗與嫁接株的根數，實生苗只有 6.6/plant，與以洋香瓜 0596 與南瓜 1913 為根砧兩種嫁接株的根數 10.1 與 8.7/plant，皆差異顯著（$p < 0.05$）。其中，嫁接株的根砧與接穗根數所佔百分比，以洋香瓜 0596 當根砧的嫁接株為 49%：51%，以南瓜 1913 當根砧的嫁接株為 47%：53%。不論根砧或接穗根部，皆有程度不一的根腐，其中實生苗與以洋香瓜 0596 為根砧嫁接株的接穗根系，根腐指數分別為 3 與 3.1，但是以南瓜 1913 為根砧嫁接株的接穗根系，根腐指數只有 1.7。另外，洋香瓜 0596 與南瓜 1913 根砧根系的根腐指數，分別為 3.1 與 1.9，

兩者差異顯著（$p < 0.05$）（表六）。

選用冬瓜 1202 當根砧時，其在試驗田中的防治效果甚不穩定（表五）。冬瓜實生苗在田間表現耐病性，但是嫁接株的冬瓜根砧，其根數僅佔整個植株根數的 30%或以下（表五），因此不足以提供嫁接株在田間賴以表現耐病性所需之強旺根系，導致防治效果不佳或不穩定的情形；嫁接株的南瓜根砧根數，則佔植株整體根數的 54%（表五），已足夠嫁接株在田間表現耐病性之所需。Cohen 等人[3]亦認為使用南瓜根砧在防治黑點根腐病上具有較高的潛力，因為南瓜植株有較旺盛的根系。另外，根據根腐指數的比較（表五），冬瓜植株對 *M. cannonballus* 的耐病性，較之南瓜亦有不及。

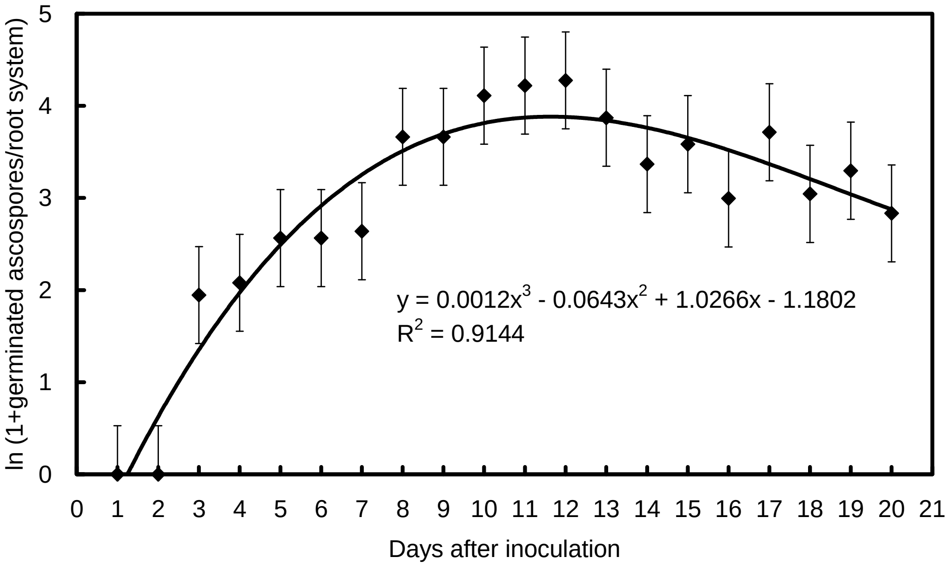
在台灣，洋香瓜的栽培模式多採用黑色塑膠布覆蓋栽培床，搭配透明塑膠矮隧道，一方面可以減少水分、肥料的流失與防止田間雜草的生長[12]，同時可增加葉的表面積，促進植株生長與提高果實品質[8]，相對的，卻提高植株地上部與地下部的比率（shoot/root ratio），亦即洋香瓜植株以較少的根系，供應本身的生長與果實的成熟，一旦根系受害（如 *Monosporascus cannonballus* 所造成的根腐），則容易產生地上部萎凋的病徵，特別是在蒸散作用旺盛的果實肥大期（約採收前 2 星期），更容易造成突發性的急速萎凋。本文利用南瓜 1913 當根砧，提供嫁接株有較多、較旺盛的南瓜根系，在田間成功的延緩黑點根腐病的發生。而 Pivonia 等人[18]則認為黑點根腐病造成地上部萎凋，是洋香瓜植株的 sink-source 失去平衡所致，他們的研究由罹病株摘除所有洋香瓜果實後，則罹病株仍可存活。因此，我們初步嘗試以疏果與嫁接的綜合防治策略，將供試植株於定植後第 8 星期進行疏果，使每棵植株僅留下 1 或 2 顆洋香瓜，結果採用疏果處理後的嫁接株（以南瓜 1913 根砧），有較低的萎凋率（表六）與較高的產量（表七）。

通常植物對土壤傳播性病原菌所表現之耐病性，與土壤中接種源的臨界濃度有關[16]，然目前仍缺乏有效率的接種法可茲應用於瓜類作物對 *M. cannonballus* 接種源臨界濃度的評估，我們已著手研究田間土壤中 *M. cannonballus* 的濃度的定量方法。另外，嫁接用的根砧亦會被黑點根腐病菌所感染，而連續使用耐病根砧之後，是否會提高土壤中 *M. cannonballus* 的初次接種源濃度，亦須特別留意。

結論與展望

洋香瓜黑點根腐病主要發生在熱帶與亞熱帶地區[2, 6, 9, 13, 14, 15, 29, 32]，據學者的研究其病原菌較適高溫環境，菌絲生長適溫為 25-35°C，子囊殼產生適溫則為25-30 °C[13]。然而，在台灣本病害四季皆會嚴重發生，由於夏季因梅雨與颱風帶來豐沛的雨水，使洋香瓜容易產生裂果，因此農民多不在夏季種植洋香瓜，秋、冬季才是洋香瓜主要產季。台灣秋、冬季戶外溫度或許會低於10℃以下，但是利用土壤溫度感應器測量土壤深度0-15 cm的土壤溫度，結果土壤溫度幾乎是保持恆溫的24-28℃（個別田會有些差異），甚至在矮隧道塑膠布覆蓋下的表土溫度更可達30℃以上，而此溫度適合本病原菌的菌絲生長[13]。本病害的發生似乎與土壤溫度有關[20]，若洋香瓜定植後30天之內，土壤溫度高於20℃以上，則到採收季節，洋香瓜容易發生黑點根腐病[19]，也就是說，洋香瓜黑點根腐病的初次感染源，子囊孢子在洋香瓜定植初期即可侵入植株根部，這些感染源在黑點根腐病的病勢發展上扮演重要的因子。而子囊孢子在土壤試管法中，接種後第三天即可發芽侵入植株根部（圖二）。子囊孢子的發芽又與土壤溫度有關，土壤溫度（介於20-32℃之間）越高，子囊孢子發芽天數越短，子囊孢子發芽並侵入植株根系的個數也越多，當土壤溫度為25℃時，子囊孢子發芽並侵入植株根系的個數在接種後30天之內達高峰；但當土壤溫度為32℃時，子囊孢子發芽並侵入植株根系的個數則在接種後15天之內便達高峰[19]。

Pivonia 等人[19]指出：雖然子囊孢子在洋香瓜幼苗根圈發芽並侵入根部組織的能力，與洋香瓜在本田發生黑點根腐病的比率成正相關。但是子囊孢子皆可在葫蘆科作物根部發芽與侵入組織（表二），而這些潛在寄主在田間卻不一定會發病。因此，子囊孢子能在植株根圈發芽並侵入根部組織，似乎不等於寄主會在田間發生黑點根腐病。我們推測：田間土壤中的子囊孢子是分批發芽，而且僅有在特殊條件下才會發芽。所以在洋香瓜生長期間內只要符合子囊孢子的發芽條件，子囊孢子是可以持續發芽與侵入植株根部。然而洋香瓜在生長初期被子囊孢子感染，才是影響洋香瓜生長後期發病的關鍵因子[19]。另外本病菌不會沿維管束感染植株地上部，病原



圖二、接種後天數對 *Monosporascus cannonballus* 子囊孢子在洋香瓜根部發芽的影響。

Fig. 2. Effect of incubation period on the germination of *Monosporascus cannonballus* ascospores around the muskmelon roots. The ascospore germination was evaluated by soil tube method employing an ascospore density of 3 x 10^3 ascospores/g soil. One seed was seeded per tube. Five tubes were assayed every day for each plant after inoculation. Error bars showed the 95% confidence interval.

菌僅會感染植株根系（表一），而病原菌在罹病株根系的侵入感染點呈現逢機點狀分佈。若將洋香瓜成株期的罹病株自土壤中拔起，則罹病的小根與細根都已脫落，主根亦容易斷落。雖然目前仍無證據顯示菌絲是本病害的接種源，但是這些已被病原菌感染的脫落小根與細根，或斷落的主根，是本病原菌菌絲生長的良好介質，而洋香瓜栽培時的土壤溫度正好適合其生長。因此推論：這些已被感染的植株殘體，才是影響洋香瓜黑點根腐病發生的主要感染源，當達臨界濃度時，則黑點根腐病發生。

本報導利用舌狀根靠接法，並篩選出南瓜 1913 根砧可於田間有效管理洋香瓜黑點根腐病之發生，使原本應該產生急速萎凋的洋香瓜植株，變成僅會產生暫時萎凋的洋香瓜嫁接株（表五、六），洋香瓜果實仍可收穫（表七），並且不會影響洋香瓜的鮮食品質。換句話說，洋香瓜黑點根腐病影

響洋香瓜果實的商品價值，乃是因為果實採收前 2 星期發生地上部萎凋的病徵所致。有學者研究將罹病株果實全部拔除，則洋香瓜罹病株不會有急速萎凋的病徵產生，但是罹病株維管束仍會產生充塞細胞（tylose）[18]。由此可知，洋香瓜黑點根腐病罹病株根系受到病原菌感染，使根系吸水功能降低，加上洋香瓜植株本身產生充塞細胞的抗病反應，使得罹病株體內的水分供需失去平衡，特別是果實肥大時需要更多的水分，則罹病株容易產生萎凋的病徵。在田間觀察中，洋香瓜在開花結果之後，才會有黑點根腐病地上部萎凋的病徵產生，特別是在著果數越多、果實越大顆的罹病株。針對此點，有學者設計特殊的滴灌方式，頻繁地將少量的水供給洋香瓜罹病株殘餘的健康根系，則可延緩罹病株地上部萎凋病徵的產生，但是果實品質仍不及健康實生苗所產的洋香瓜[17]。因為洋香瓜果實屬於更年性果實（climacteric fruit）[1]，果實的成熟與根部分泌的植物賀爾蒙有關。當洋香瓜根系發生嚴重根腐時，雖然可用滴灌方式供應足夠植物吸收的水分，卻無法提供足量的植物賀爾蒙可供果實成熟。若採用舌狀根靠接法，嫁接株仍保有 54%低根腐指數的南瓜根砧（表五），該些根系或可提供嫁接株生長所需的水分與果實成熟所需的植物賀爾蒙，使嫁接株僅表現暫時萎凋的病徵，並且可採收具商品價值的洋香瓜。

在台南地區，有農民種植洋香瓜時會先將本田淹水，以直播種子的栽培方式，農民不需要另闢苗圃來培育洋香瓜幼苗，亦可避免苗床的病蟲害問題，而洋香瓜直播於本田後，胚根可直接深入本田土中，避免日後定植時可能造成的機械性傷害。過去我們曾在田間採用直播栽培模式種植洋香瓜[26]，然而這樣的栽培模式卻不適合舌狀靠接法的操作，因為舌狀靠接苗需將根砧與接穗種子放置在同一栽培穴中，若同時間將兩顆種子直播於本田，則兩顆種子的發芽與生長速度會不一樣，嫁接的時間與嫁接的位置不容易掌握；若依根砧與接穗種子發芽與生長的速度為考量，於不同時間將此兩顆種子分別直播於本田，則實務操作費時、費工，種子發芽的情形亦不盡理想。另外，在嫁接實作時，工作人員需在矮隧道中進行，勞心又勞力，且工作效率不彰。因此，建議往後製作舌狀嫁接苗時，應先於育苗盤中製備完成，在定植嫁接苗於本田。這樣的操作模式容易依根砧與接穗種子的發芽與生長速度，調整催芽與播種於育苗盤的時

表五、洋香瓜舌狀根靠接株在七股鄉田間由黑點根腐病所致之萎凋率與根腐指數 [1]

Table 5. The wilt rate and root rot index of muskmelon tongue root inarching grafts due to root rot/vine decline at Chigu field [1]

Field	Rootstock	Wilt rate (%) Weeks after transplanting			Root number per plant	Root number/ Percentage		Root rot index (0-4)[2]	
		8	11	12		Rootstock	Scion	Rootstock	Scion
I	CK (non-grafting)	0	76 b	76 b[3]	6.8 b	-[4]	6.8/100	-	2.6 b
	Wax gourd 1202	0	89 b	89 b	8.1 a	1.7/28	6.4/72	3.8 b	2.6 b
	Squash 1913	0	23 a	2 a	8.2 a	4.7/54	3.5/46	1.1 a	1.2 a
II	CK (non-grafting)	0	95 b	95 c	6.7 b	-	6.7/100	-	2.8 b
	Wax gourd 1202	0	80 a	80 b	8.0 a	1.7/20	6.4/80	3.8 b	2.7 b
	Squash 1913	0	67 a	37 a	7.9 a	4.4/54	3.6/46	1.6 a	1.7 a

1 Two hundred and 240 plants were assayed for each treatment in the experimental fields I and II, respectively, at Chigu, Tainan. The date of transplanting was 7 and 9 November, 2005, and of harvesting 8 and 9 February, 2006, respectively.

2 After harvest, all of the roots were collected for determining the root rot index, based on a scale of 0-4: 0=Healthy; 1=Red lesion; 2=Necrotic spot; 3=Root rot; and 4=Perithecia formed on root surface.

3 Values followed by the same letter in the column are not significantly different at p> 0.05, according to LSD Test.

4 "—" = No data.

表六、洋香瓜舌狀根靠接株在西港鄉田間由黑點根腐病所致之萎凋率與根腐指數[1]

Table 6. The wilt rate and root rot index of muskmelon tongue root inarching grafts due to root rot/vine decline at Sigang field[1]

Rootstock	Wilt rate (%) weeks after transplanting				Root number per plant	Root number/ Percentage		Root rot index (0-4)[2]	
	7	8	9	10		Rootstock	Scion	Rootstock	Scion
Non-grafting	0	7 a[3]	36 a	43 ab	6.6 c	-[4]	6.6/100	-	3 a
Muskmelon 0596	0	15 a	38 a	57 b	10.1 a	4.9/49	5.2/51	3.1 a	3.1 a
Squash 1913	0	1 a	14 a	19 a	8.7 b	4.1/47	4.7/53	1.9 b	1.7 b

1 One hundred and sixty plants of each treatment were assayed. The seeding date was at 7 August 2007 and grafting was done the next 2-3 weeks. The harvesting date was 6 and 9 November 2007.

2 After harvest, all of the roots were collected for determining the root rot index, based on a scale of 0-4: 0=Healthy; 1=Red lesion; 2=Necrotic spot; 3=Root rot; and 4=Perithecia formed on root surface.

3 Values followed by the same letter in the column are not significantly different at $p > 0.05$, according to LSD Test.

4 "－"= No data.

表七、不同根砧對洋香瓜舌狀根靠接株洋香瓜產量的影響（2007）[1]

Table 7. Effect of different rootstocks on yield of muskmelon tongue root inarching grafts (2007) [1]

Rootstock	1st harvest Fruit (numbers/40 plants)	1st harvest Fruit weight (kg/fruit)	1st harvest Yield (kg/40 plants)	2nd harvest Fruit (numbers/40 plants)	2nd harvest Fruit weight (kg/fruit)	2nd harvest Yield (kg/40 plants)	Total yield (kg/40 plants)
Non-grafting	31 a	1.75 a	53.8 a	19 b	1.64 a	31.2 b	84.9 a
Muskmelon 0596	24 a	1.71 a	40.4 a	21 b	1.43 a	30.4 b	70.8 a
Squash 1913	22 a	1.64 a	36.1 a	44 a	1.46 a	64.2 a	100.3 a

1. One hundred and sixty plants of each treatment were assayed. The seeding date was at 7 August 2007 and grafting was done the next 2-3 weeks. The harvesting date was 6 and 9 November 2007.

2. Values followed by the same letter in the column are not significantly different at $p > 0.05$, according to LSD Test.

間，使根砧與接穗的嫁接位置達同一生長高度，方便舌狀靠接苗的製作；而嫁接實作時，人員僅需在嫁接工作台上進行，可提升工作效率與嫁接成功率，亦可方便代工生產嫁接苗。

引用文獻

1. Bower, J., Holford, P., Latche., and Pech, J-C. 2002. Culture conditions and detachment of the fruit influence the effect of ethylene on the climacteric respiration of melon. Postharvest Boil. Tec. 26: 135-146.
2. Bruton, B. D., and Miller, M. E. 1997. Occurrence of vine decline diseases of muskmelon in Guatemala. Plant Dis. 81: 694.
3. Cohen, R., Pivonia, S., Burger, Y., Edelstein, M., Gamliel, A., and Katan, J. 2000. Toward integrated management of Monosporascus wilt of melons in Israel. Plant Dis. 84: 496-505.
4. Cohen, R., Pivonia, S., Shtienberg, D., Edelstein, M., Raz, D., Gerstl, Z., and Katan, J. 1999. The efficacy of fluazinam in suppression of *Monosporacus cannonballus*, the causal agent of vine decline of melons. Plant Dis. 83: 1137-1141.
5. Edelstein, M., Cohen, R., Burger, Y., Shriber, S., Pivonia, S. and Shtienberg, D. 1999. Integrated management of sudden wilt in melons, caused by *Monosporascus cannonballus*, using grafting and reduced rates of methyl bromide. Plant Dis. 83: 1142-1145.
6. Garcia-Jimenez, J., Velazquez, M. T., Jorda, C., and Alfaro-Garcia, A. 1994. Acremonium species as the causal agent of muskmelon collapse in Spain. Plant Dis. 78: 416-419.
7. Hawksworth, D. L., and Ciccarone, A. 1978. Studies on a species of *Monosporascus* isolated from *Triticum*. Mycopathologia 66: 147-151.
8. Ibarra, L., Flores, J., and Diaz-Perez, J. C. 2001. Growth and yield of muskmelon in response to plastic mulch and row covers. Sci. Hortic. 87:

139-145.

9. Karlatti, R. S., Abdeen, F. M., and Al-Fehaid, M. S. 1997. First report of *Monosporascus cannonballus* on melons in Saudi Arabia. Plant Dis. 81: 1215.
10. Lin, Y. S., Su, J. F., and Huang, K. S. 2004. Grafting management of Fusarium wilt and root rot/vine decline of cucurbitaceous plants in Taiwan. Pages 119-136 in: Proceedings of 2004 Symposium on the Health Management of Fruity Vegetable. Yang, H. C., and Lin, H. S. ed. Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Taichung, 236 pp. (In Chinese).
11. Lin, Y. S., Su, J. F., and Lin, K. M. 2008. The host range of *Monosporascus cannonballus* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 17: 25-34. (in Chinese with English abstract)
12. Lovelli, S., Pizza, S., Caponio, T., Rivelli, A. R., and Perniola, M. 2005. Lysimetric determination of muskmelon crop coefficients cultivated under plastic mulches. Agric. Water Manage. 72: 147-159.
13. Martyn, R. D., and Miller, M. E. 1996. Monosporascus root rot and vine decline: An emerging disease of melons worldwide. Plant Dis. 80: 716-725.
14. Martyn, R. D., Lovic, B. R., Maddox, D. A., Germash, A., and Miller, M. E. 1994. First report of Monosporascus root rot/vine decline of watermelon in Tunisia. Plant Dis. 78: 1220.
15. Mertely, J.C., Martyn, R.D., Miller, M. E., and Bruton, B. D. 1993. An expanded host range for the muskmelon pathogen *Monosporascus cannonballus*. Plant Dis. 77: 667-673.
16. Navas-Cortes, J. A., Alcala-Jimenez, A. R., Hau, B., and Jimenez-Diaz, R. M. 2000. Influence of inoculum density of race 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on development of Fusarium wilt in chickpea cultivars. Eur. J. Plant Pathol. 106: 135-146.

17. Pivonia, S., Cohen, R., Cohen, S., Kigel, J., Levita, R., and Katan, J. 2004. Effect of irrigation regimes on disease expression in melon plants infected with *Monosporascus cannonballus*. Eur. J. Plant Pathol. 110: 155-161.
18. Pivonia, S., Cohen, R., Katan, J. and Kigel, J. 2002a. Effect of fruit load on the water balance of melon plants infected with *Monosporascus cannonballus*. Physiol. Mol. Plant P. 60: 39-49.
19. Pivonia, S., Cohen, R., Kigel, J., and Katan, J. 2002b. Effect of soil temperature on disease development in melon plants infected by *Monosporascus cannonballus*. Plant Pathol. 51: 472-479.
20. Pivonia, S., Kigel, J., Cohen, R., Katan, J. and Levita, R. 1999. Effect of soil temperature on the development of sudden wilt of melons. Phytoparasitica 27: 42-43.
21. Pollack, F. G., and Uecker, F. A. 1974. *Monosporascus cannonballus* an unusual ascomycete in cantaloupe roots. Mycology 66: 346-349.
22. Ristaino, J. B., and Thomas, W. 1997. Agriculture, methyl bromide and the ozone hole, can we fill the gap? Plant Dis. 81: 964-977.
23. Sivanesan, A. 1991. IMI descriptions of fungi and bacteria No. 1035. *Monosporascus cannonballus*. Mycopathologia 114: 53-54.
24. Stanghellini, M. E., and Rasmussen, S. L. 1992. A quantitative method for the recovery of ascospores of *Monosporascus cannonballus* from field soil. Phytopathology 82: 1115.
25. Stanghellini, M. E., Kim, D. H., and Rasmussen, S. L. 1996. Ascospores of *Monosporascus cannonballus*: Germination and distribution in cultivated and desert soils in Arizona. Phytopathology 86: 509-514.
26. Su, J. F., and Lin, Y. S. 2008. The grafting management in root rot/vine decline of muskmelon. Plant Pathol. Bull. 17: 35-41. (in Chinese with English abstract)
27. Su, J. F., Huang, K. S., and Lin,Y. S. 2001. Control of the root rot and vine decline of muskmelon by resistant rootstock. Plant Pathol. Bull. 10: 205.

(In Chinese).

28. Traka-Mavrona, E., Koutsika-Sotiriou, M., and Pritsa, T. 2000. Response of squash (*Cucurbita* spp.) as rootstock for melon (*Cucumis melo* L.). Sci. Hort. 83: 353-362.
29. Tsay, J. G., and Tung, B. K. 1994. The occurrence of muskmelon root rot caused by *Monosporascus cannonballus* Pollack & Uecker in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 3: 260. (In Chinese).
30. Ucko, O., Maduel, A., Grinstein, A., and Katan, J. 1992. Combined methods of soil disinfestation for controlling melon collapse with reduced methyl bromide dosages. (Abstr.) Phytoparasitica 20: 229-230.
31. Uematsu, S., Hirota, K., Shiruishi, T., Ooizumi, T., Sokiyama, K., Ishikura, I., and Edagowa, Y. 1992. Monosporascus root rot on bottle gourd stock of watermelon caused by *Monosporascus cannonballus*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 58: 354-359.
32. Uematsu, S., Onogi, S., and Watanabe, T. 1985. Pathogenicity of *Monosporascus cannonballus* Pollack and Uecker in Relation to Melon root rot in Japan. Ann. Phytopath. Soc. Japan 51: 272-276.
33. Wolff, D. W., and Miller, M E. 1998. Tolerance to Monosporascus root rot and vine decline in melon (*Cucumis melo* L.) germplasm. HortScience 33: 287-290.
34. Zhang, J. X., Howell, C. R., and Miller, M. E. 1998. Evaluation of *Trichoderma virens* as a potential biocontrol agent of *Monosporascus cannonballus* in muskmelon. Phytopathology 88: S12.

ABSTRACT

The occurrence of root rot/vine decline of muskmelon and its disease management by grafting

Lin, Y. S.[1], and Su, J. F.[2,3]

[1] Department of Biotechnology, Asia University, Wufeng, Taichung County, Taiwan, R.O.C.

[2] Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung County, Taiwan, R.O.C.

[3] Corresponding author, Email: forte9135101@tari.gov.tw

Monosporascus cannonballus caused root rot/vine decline of muskmelon. Sudden wilt of most infected plants occurred in the field at 2 weeks before harvesting. In greenhouse inoculation tests, using soil tube method, the ascospores could germinate in the rhizosphere and the hyphae penetrated into root tissues in such plants as muskmelon, Japanese cantaloupe, oriental pickling melon, cucumber, wax gourd, squash, watermelon, bottle gourd, loofah and bitter gourd. Field survey results showed that the host range of *M. cannonballus* included muskmelon, Japanese cantaloupe, oriental pickling melon, cucumber, wax gourd and bottle gourd as rootstock for watermelon in Taiwan. Besides the muskmelon, which was usually seriously damaged, the root rot/vine decline in other 5 cucurbit plants were limited to some locations in Fangyuan of Changhua County or in the greenhouse. In addition, this pathogen could only be isolated from infected roots. The isolation rates were low when the inoculum was taken from badly rot tissues of infected plants. Using root tissues with a root rot index in the range of 0 to 4, the isolation rates obtained were 69, 82, 73, 40 and 9%, respectively. The muskmelon tongue root inarching grafts was provided the basis for disease management of root rot/vine decline of muskmelon. In field experiments, the grafts on squash 1913 rootstock gave a stable, positive performance on disease management. Although the root system of rootstock plants was also infected by *M. cannonballus*, they displayed a relatively low root rot index of 1.1 and 1.6 in the two fields, respectively. There was 54% of

the total root numbers found to derive from the rootstock plant. By harvest time, the grafts showed a phenomenon of temporary wilting in which the plants wilted during the day and would recover at night or in a later time under certain circumstances. A normal harvest of high quality fruit of muskmelon was possible.

Key words： root rot/vine decline of muskmelon, host range, *Monosporascus cannonballus*, tongue root inarching, grafting

瓜類細菌性果斑病：病原菌檢測與病害管理

曾國欽[1,5]、呂昀陞[1,2]、鄭安秀[3]、黃德昌[4]、徐世典[1]

[1] 台中市 國立中興大學植物病理學系

[2] 台中縣霧峰鄉 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組

[3] 台南縣新化鎮 行政院農業委員會臺南區農業改良場

[4] 屏東縣長治鄉 行政院農業委員會高雄區農業改良場

[5] 聯絡作者，電子郵件信箱：kctzeng@nchu.edu.tw

摘　　要

瓜類細菌性果斑病 (Bacterial fruit blotch of cucurbits) 由 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* 所引起。在台灣瓜類細菌性果斑病菌可感染西瓜、甜瓜及苦瓜等瓜類作物外，亦可感染荖葉；其病徵隨寄主種類或品系之不同而有差異。此病菌之最初感染源主要為帶菌之種子與種苗，病原菌於種子發芽時入侵子葉呈現水浸狀斑點，病斑上泌出之細菌藉由噴灌之水飛濺至附近健康之種苗，此外亦可經由嫁接無病徵帶菌接穗傳播。溫暖潮溼多雨環境，有利於果斑病於田間之發生。果斑病菌可由氣孔或傷口感染果實，成熟之果實表面為臘質覆蓋，因此幼果常較成熟果實感病。瓜類細菌性果斑病菌為國際瓜類產業重視之病原細菌，準確、靈敏、快速之檢測技術，為生產瓜類健康種子(苗)及防範病害發生之重要關鍵技術。栽種未帶菌之種子、種苗為防範本病害發生之重要措施；必要時以1%稀鹽酸、81.3%嘉賜銅可濕性粉劑或10%鏈四環黴素處理帶菌種子可降低發病率；重視田間衛生，發現可疑病葉病果應立即清除，降低病害蔓延；採用隧道栽培，可減少雨水飛濺造成病原細菌之散播。

關鍵詞：瓜類細菌性果斑病、瓜類細菌性果斑病菌、種媒病害

緒　　言

瓜類細菌性果斑病（Bacterial fruit blotch of cucurbits）由 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae citrulli*（原名 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*）所引起[23, 29]。於 1969 年本病害最早發生於美國佛羅里達州西瓜田，由於病害發生並不嚴重而未受到重視。直到 1989 年此病害相繼發生於美國佛羅里達州，南卡羅來納州及印地安那州等地，以及美國西瓜栽培地區亦陸續發生，使得美國西瓜產業遭受嚴重損失，更引起種子公司與西瓜栽培業者間之司法訴訟，使本病害受各界之重視[19]。瓜類細菌性果斑病菌除了危害西瓜外還可以危害甜瓜、苦瓜及南瓜等瓜類作物[16, 18, 20]。於 1992~1993 年間在台灣曾發生類似之病害，然農民以疫病或炭疽病視之，直至 1994 年高屏大橋下西瓜田及各地區相繼發生本病害，造成嚴重損失而受重視，經診斷鑑定證實為細菌性果斑病菌所引起，此後在台東、花蓮、雲林、嘉義、台中、苗栗、及宜蘭等地亦有此病害發生[4]。在台灣發病嚴重之瓜田罹病率可達60%以上，受感染之瓜類作物主要有西瓜、甜瓜與苦瓜等，造成農民損失甚鉅[4, 6, 7]。瓜類細菌性果斑病菌為我國檢疫病原之一，此病菌主要經種子傳播[8, 15, 21, 25]，為防止病菌之入侵及擴散，準確、快速地檢測種子帶菌情形實為防範本病害之重要關鍵，本文將針對瓜類細菌性果斑病菌之特性、檢測技術與病害管理策略等進行介紹。

瓜類細菌性果斑病菌之特性與分類

瓜類細菌性果斑病菌之分類

瓜類細菌性果斑病菌最初在 1978 年首次發現時被定名為 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*，屬於非螢光之 *Pseudomonas*[23]，之後 Willems 等人[29]將其重新命名為 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*，而 Schaad 等人[22]依據 DNA 雜合、脂肪酸圖譜分析與內轉錄區間序列分析之結果，將其自亞種提升為種並定名為 *A. citrulli*，然目前此學名尚未被廣泛使用，在國際間仍以 *A. avenae* subsp. *citrulli* 為瓜類細菌性果斑病菌最常使用之學名。

瓜類細菌性果斑病菌之生理生化特性

瓜類細菌性果斑病菌為革蘭氏陰性好氣菌，可在 41℃生長，無法利用葡萄糖作為唯一的碳素源，在 king's B 培養基上為非螢光性，具有解脂作用(lipolytic activity)，能引起菸草葉片之過敏性反應（hypersensitivity reaction），明膠(gelatin)水解反應較弱或延遲，不具精氨酸二水解酵素（arginine dihydrolase），在 crystal violet pectate（CVP）培養基上不引起凹陷，不水解澱粉（starch hydrolysis），在石蕊牛奶測試中呈鹼性並有沉澱物產生，可利用 soidum citrate, ethanol, ethanolamine, citraconate, adipate, D-sorbitol, β-alanine, L-arabinose, D-galactose, D-ribose, DL-tartrate, 2-ketoglutrate 等碳素源，但對 L-histidine, L-threonine 與 D-mannitol 則不會利用[22, 29]。

瓜類細菌性果斑病菌菌株之差異性

Walcott 等人[28]依據 DNA 指紋圖譜分析、脂肪酸圖譜分析、碳素源利用與病原性之差異，將瓜類細菌性果斑病菌區分為兩群，其中 group I 主要來自非西瓜寄主所分離之菌株，而 group II 則主要由西瓜種苗與果實所分離之菌株，此兩群菌株在病原性上亦存在有差異，其中 group I 菌株在非西瓜寄主上之毒力較 group II 菌株強，反之 group II 菌株在西瓜上之毒力較強；在台灣分離之瓜類細菌性果斑病菌以 RAPD 技術進行 DNA 指紋圖譜分析，可將供試菌株分為 R1 與 R2 兩群，其中 R1 菌株主要來自西瓜之菌株，而 R2 菌株則主要來自甜瓜之菌株，而苦瓜之菌株係歸屬於 R2 之中；以 Biolog 系統進行碳素源分析，可將台灣果斑病菌菌株區分為 B1、B2 與 B3 三群，其中 B1 群菌株主要來自於西瓜之菌株，B2 群菌株則主要分離自甜瓜，B3 之菌株則主要為苦瓜之菌株[10]。

瓜類細菌性果斑病菌之寄主與病徵

瓜類細菌性果斑病菌田間寄主主要為西瓜、甜瓜，但其他瓜類作物如胡瓜[20]、矮南瓜與南瓜[18]皆為其寄主，在台灣之田間寄主除了西瓜與甜瓜

外，還包括苦瓜與胡椒科之荖葉[11]。本病害之病徵依其所感染之寄主不同而有所差異，其中西瓜於苗期受感染時，子葉和真葉初期呈現水浸狀斑點，後為褐色壞疽斑，當胚軸部分受到感染時，則可引起幼苗倒伏死亡，易被誤判為疫病菌所引起。於成株時，罹病植株真葉呈現褐色病斑，然相對溼度高時，病斑可沿葉脈中肋擴展。西瓜果實受害時，果皮朝上表面出現水浸狀小斑點，逐漸擴大成為不規則的橄欖色水浸狀塊斑[4, 17]。罹病初期病組織只侷限在果皮，內部果肉組織正常，後期罹病的果實表皮常有龜裂現象，內部伴隨腐生菌的入侵使果實腐爛[19]。甜瓜苗期受瓜類細菌性果斑病菌感染時，病徵與西瓜相似，成株真葉受感染時，亦會出現褐色病斑，高溼度時病斑上可見乳白色菌泥溢出，葉部病斑處後期常破裂。光滑表皮之甜瓜果實病徵與西瓜果實上之病徵類似，常呈現大型不規則的橄欖色水浸狀塊斑，在網紋洋香瓜品系之罹病果實，表面則呈現凹陷之褐色壞疽斑，病斑不會擴大，病斑附近之內部果肉呈現褐色壞疽情形[4, 7, 16]。瓜類細菌性果斑病菌感染苦瓜時，罹病葉片呈現褐色壞疽病斑，罹病之果實表面則呈現水浸狀褐色病斑，溼度高時可逐漸擴大[7]。

瓜類細菌性果斑病菌之生態特性

瓜類細菌性果斑病菌可殘存於種子內部及表面，且其存活能力甚強，經 4～5℃冷藏與-18 冷凍儲存計 34～40 年之甜瓜與西瓜種子，仍具致病力[9]，而帶菌之種子為本病害之主要初次感染源[15, 21, 25]，病原菌於種子發芽時入侵子葉呈現水浸狀斑點，再藉雨水或噴灌之水飛濺，由少數之罹病幼苗散播。帶菌之幼苗移植於田間後，可再藉雨水或灌溉水而將病原菌散播於田間[21]；本病害之發生受環境因子影響甚巨，在高溫多濕環境下，本病害發生較為嚴重，且罹病組織常可泌出菌泥，因而成為田間重要之感染源。果斑病菌可經由氣孔和傷口侵入植株，然成熟之瓜果表面常會被臘質所覆蓋，因此幼果較成熟果實較為感病。瓜類細菌性果斑病菌之感染源除帶菌種子外，罹病果實於田間腐爛時，殘留於田間之帶菌種子所長出自生瓜苗與罹病植株殘體及葫蘆科野生植物等，皆可成為田間之感染源[8, 13, 21]。

瓜類細菌性果斑病菌之種子檢測技術

植物病原細菌之種子檢測可藉由種子長出試驗[13]、選擇性培養基[12, 24]、血清學技術[1]、核酸探針及聚合酵素連鎖反應[2, 3, 5, 27]等技術進行，其中以種子長出試驗技術可有效檢測出具有病原性之細菌，因此許多種子檢測機構目前仍以此測驗為主要測試項目。由於種子長出試驗相當耗費人力與物力[13]，因此種子檢測機構常利用選擇性培養基或血清學技術作為初步之檢測方式[13, 24]，近年來核酸檢測技術之發展，因此許多以 PCR 技術為基礎之檢測技術相繼問世，此些技術不僅具有極高之靈敏度並可縮短檢測所需耗費之時間，然目前尚未有相關PCR檢測技術被國際種子檢查協會所認證，因此目前瓜類細菌性果斑病菌之主要檢測方式仍以種子長出試驗、選擇性培養基與血清學技術作為其主要種子檢測方式，茲將各類種子檢測技術簡述如下：

種子長出試驗

種子長出試驗係將種子播種於滅菌之介質中，並將其放置於相對溼度高於70%且溫度介於24~35℃之環境，以滴灌取代頂灌以避免飛濺導致病菌散播，待種子發芽長出子葉與真葉後，觀察有無罹病之植株，然此方式每批測試種子數量約需10,000~30,000 顆或10%之種子數，因此所需耗費之人力與物力極大，且需較長之檢測時間(約 21 天)，然此方法準確度高，可檢測出具病原性之果斑病菌[13]。

選擇性培養基

選擇性培養基係可將瓜類細菌性果斑病菌與其他植物病原細菌進行區分之工具，目前常用之選擇性培養基包含 WFP68[12]、WFP68M[5]與 AacSM[24]等，其中 WFP68 係利用果斑病菌具有 lipase 可將脂質分解之能力，因此果斑病菌可在此培養基上形成白色之沉澱，但由於 WFP68 之選擇性較差，因此楊氏進一步開發 WFP68M，並在其中添加 25ppm cefoperazone、10ppm ceftriaxone 及 25pp piperacillin 三種抗生素，因此可有效增加其選擇性[5]；此

外 AacSM 為日本所開發出之果斑病菌選擇性培養基，日本當地利用此選擇性培養基配合塑膠袋種子發芽技術可有效檢測瓜類細菌性果斑病菌之存在[24]，然選擇性培養基之效能常因不同地區之微生物相不同而受影響。

血清學技術

血清學技術已廣泛應用於多種植物病原細菌之種子檢測上，在美國亦有許多公司開發有可供快速檢測瓜類細菌性果斑病菌之 ELISA 或 strip 套組，例如：Flashkit® Agdia Inc., USA，在台灣王氏與鄭氏等人[1]亦製備出果斑病菌之多元抗體，利用此一抗體可有效檢測台灣地區之瓜類果斑病菌，以免疫擴散反應測試結果顯示此抗血清與西瓜、甜瓜和苦瓜所分離之 *A. avenae* subsp. *citrulli* 菌株皆可形成兩條明顯之反應帶，然此抗血清與供試之柑橘潰瘍病菌（*Xanthomonas axonopodis pv. citri* XW4）、甘藍黑腐病菌（*X. campestris pv. campestris* XCH4）、青蔥軟腐病菌（*Pectobacterium chrysanthemi* Brs4）、洋蔥軟腐病菌（*P. carotovorum subsp. carotovorum* Bsr9）、芒果黑斑病菌（*X. campestris pv.mangiferiaeindicae* XCM25-1）及其他種之植物病原細菌，皆無法形成任何之反應帶。以間接 ELISA 及雙層夾心式酵素聯結抗體檢測法（double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay, DAS-ELISA）測試結果顯示，其靈敏度分別為 10^4 和 10^5 cfu /ml。

核酸檢測技術

目前 PCR 技術為最廣泛被應用植物病原細菌檢測之核酸技術，而針對瓜類細菌性果斑病菌，目前已有多組引子被開發如：SL1/SR1[2]、SEQID4/SEQID5、WFB1/WFB2、Seminis WFB1/Seminis WFB2 ，其中，引子對 SL1/SR1 及 SEQID4/SEQID5 對 *A. avenae* subsp. *citrulli* 具有較佳之專一性，而引子對 WFB1/WFB2 及 Seminis WFB1/Seminis WFB2 之專一性較低，對 *Acidovorax* 屬其他種病原細菌亦有反應條帶出現；靈敏度測試之結果顯示 SL1/SR1 之測試靈敏度最佳可達 1 pg，SEQID4/SEQID5 之靈敏度為

50 pg，WFB1/WFB2 之靈敏度為5 pg，而 Seminis WFB1/Seminis WFB2 之靈敏度為5 pg。此外為增強應用 PCR 技術檢測瓜類細菌性果斑病菌之效能，因此許多相關技術相繼開發，例如 BIO-PCR、IMS-PCR（Immunomagnetic separation and polymearse chain reaction）與 real-time PCR 等，BIO-PCR 即是利用選擇性培養基先對種子所帶之果斑病菌進行增量培養，之後再進行 PCR 反應，如此即可提升檢測之效率，然此技術需經過一天之增量培養因此其所需之時間較長；IMS-PCR 則是結合免疫磁珠分離法與聚合酵素連鎖反應則可將其靈敏度提高。其原理係將磁珠（magnetic bead）與細菌性果斑病菌之抗體聯結後，利用此磁珠吸附樣品中之細菌性果斑病菌，再以磁力濃縮機（magnetic particle concentrator）收集吸附有細菌性果斑病菌之磁珠，再進行 PCR 反應，此方法可去除樣品中 PCR 之干擾物質，並可增加其偵測靈敏度[27]。IMS-PCR 在瓜類種子中細菌性果斑病菌之檢測上，具有實際應用之潛力[27]。Real-time PCR 技術則是利用螢光訊號進行檢測，並利用核酸探針增加其專一性，因此可在短時間內準確檢測出果斑病菌，且靈敏度可達 10 pg，以此技術對天然帶菌種子檢測，亦可在 Ct 值約為 30 時出現檢測之訊號，此外 real-time PCR 技術除可有效檢測果斑病菌外，還可針對果斑病菌進行定量，因此還可作為監測果斑病菌在田間族群之重要工具[3]。

病害管理

瓜類細菌性果斑病菌對瓜類產業具有重大之威脅，此病害之發生常受環境因子及栽培管理等之影響，茲將瓜類細菌性果斑病之管理策略說明如下：

慎選栽植區域與種子、種苗

瓜類細菌性果斑病菌在環境之殘存能力較差，但在有罹病組織之環境下或種子上其殘存能力甚強，在種子上之殘存甚至可達 30~40 年之久[9]，帶菌種子為本病害主要之最初感染源，所以要防治本病害首先即要針對種植區域進行選擇，盡量避免栽植於果斑病罹病田附近，以避免田間殘留之病

原菌感染新種植之瓜類作物，此外使用之種子種苗應經過檢測，避免使用來源不明或可能帶菌之種子，如此方可避免病原菌入侵栽培區域[26]。

注意田間衛生

瓜類細菌性果斑病菌可在瓜類作物雜草上殘存然不顯現病徵，因此在田間管理時應注意田間環境之管理，適時清除田間雜草，當環境中發現有疑似罹病之植株時，應盡速將其去除，以避免成為田間之二次感染源，使病害迅速擴大[26]。

改善灌溉方式與避免雨水飛濺

瓜類細菌性果斑病菌可藉由風雨在田間散播，因此避免雨水飛濺成為其相當重要之管理策略，但在田間許多業者常使用頂灌方式澆水，而此方式所造成之飛濺不亞於雨水之影響，因此建議應改利用滴灌之方式來減少雨水飛濺，此外在大雨過後或灌溉過後應避免人為操作將病原菌進行散佈，而若能利用隧道式栽培之模式可有效降低雨水飛濺，而降低瓜類細菌果斑病菌在田間之散播機會。

化學防治與種子處理

利用10%鏈四環黴素與嘉賜銅(81.3%)等藥劑對瓜類細菌性果斑病菌皆有抑制效果，因此可利用此些藥劑進行種子之消毒[6]，此外利用漂白水、50 ppm 二氧化氯與 1%稀鹽酸浸泡種子亦可達到種子消毒之效果[14]。

結　　論

瓜類細菌性果斑病菌為國際瓜類產業重視之重要植物病原細菌。種子公司與種苗生產業者於生產瓜類種子種苗流程中，應重視瓜類細菌性果斑病之管理，以生產高品質之瓜類種子種苗。研發準確、靈敏、快速之檢測技術，為生產瓜類健康種子 (苗) 及防範病害發生之重要技術。結合應用不

同之檢測技術可提高瓜類細菌性果斑病之檢測靈敏度。此外瓜類細菌性果斑病可藉由病害管理降低病害之發生。本文內容可作為種子公司與種苗生產業者參考之用，以減少瓜類果斑病菌所造成之危害。

引用文獻

1. 王惠亮、鄭安秀。 2001。 瓜類細菌性果斑病菌血清偵測技術之研發. 植病會刊 10：129-138。
2. 宋秉峰。 1999。 鑑定及偵測瓜類細菌性果斑病菌之聚合酵素連鎖反應技術. 國立中興大學碩士論文。
3. 宋秉峰、呂昀陞、朱家慶、徐世典、曾國欽。2008。瓜類細菌性果斑病菌 SYBR Green real-time PCR 檢測檢測技術之開發。植病會刊 17:81。
4. 唐致仁. 1997. 西瓜細菌性果斑病菌之研究. 國立中興大學碩士論文
5. 楊文仁。 2001。 西瓜及甜瓜種子上細菌性果斑病菌之偵測。國立中興大學碩士論文。
6. 鄭安秀、許瑛玲、黃德昌、王惠亮。 2000。 甜瓜對細菌性果斑病菌之感受性及果斑病之防治。植病會刊 9：151-156。
7. 鄭安秀、黃德昌。1998。 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* 引起的甜瓜和苦瓜細菌果性斑病。 植病會刊 7：216。
8. Bahar, O., Kritzman, G., and Burdman, S. 2009. Bacterial fruit blotch of melon: screens for disease tolerance and role of seed transmission in pathogenicity. Europ. J. Plant Pathol. 123:71-83.
9. Block, C. C., and Shepherd, L. M. 2009. Long-term survival and seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in melon and watermelon seed. Phytopathology 99:S119.
10. Chen, M. S. 2003. Genetic diversity of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in Taiwan. Master thesis. Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan.
11. Deng, W. L., Huang, T. C., and Tsai, Y. C. 2010. First report of *Acidovorax*

avenae subsp. *citrulli* as the causal agent of bacterial leaf blight of betelvine in Taiwan. Plant Dis. 94:1065-1065.

12. Gitaitis, R. D. 1993. Development of a semiselective medium for *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, causal agent of watermelon fruit blotch. Dept. of Plant Pathology, University of Georgia, Coastal Plain Experiment Station, Tifton, GA 31793-0748, USA.
13. Gitaitis, R. D., and Walcott, R. R. 2007. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. Annu. Rev. Phytopathol. 45:371-397.
14. Hopkins, D. L. 1991. Control of bacterial fruit blotch of watermelon with cupric hydroxide. Phytopathology 81:1228.
15. Hopkins, D. L., and Thompson, C. M. 2002. Seed transmission of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in cucurbits. Hortscience 37:924-926.
16. Isakeit, T., Black, M. C., Barnes, L. W., and Jones, J. B. 1997. First report of infection of honeydew with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Plant Dis. 81:694-694.
17. Isakeit, T., Black, M. C., and Jones, J. B. 1998. Natural infection of citron melon with *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Plant Dis. 82:351-351.
18. Langston, D. B., Walcott, R. D., Gitaitis, R. D., and Sanders, F. H. 1999. First report of a fruit rot of pumpkin caused by *Acidivorax avenae* subsp. *citrulli* in Georgia. Plant Dis. 83:199-199.
19. Latin, R. X., and Hopkins, D. L. 1995. Bacterial fruit blotch of watermelon: the hypothetical exam question becomes reality. Plant Dis. 79:761-765.
20. Martin, H. L., O'Brien, R. G., and Abbott, D. V. 1999. First report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as a pathogen of cucumber. Plant Dis. 83:965-965.
21. Rane, K., and Latin, R. X. 1992. Bacterial fruit blotch of watermelon: association of the pathogen with seed. Plant Dis. 76:509-512.
22. Schaad, N. W., Postnikova, E., Sechler, A., Claflin, L. E., Vidaver, A. K.,

Jones, J. B., Agarkova, I., Ignatov, A., Dickstein, E., and Ramundo, B. A. 2008. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* (Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. Syst. and Appl. Microbiol. 31: 434-446.

23. Schaad, N. W., Sowell, G., Goth, R. W., Colwell, R. R., and Webb, R. E. 1978. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 28:117-125.
24. Shirakawa, T., Aizawa, M., Komiya, Y., and Abiko, K. 2000. Development of semiselective medium for isolation and detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* from seeds and plant materials. (Abstr.) Jpn. J. Phytopathol. 66:132.
25. Sowell, J. G., and Schaad, N. W. 1979. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* on watermelon: seed transmission and resistance of plant introductions. Plant Dis. 63:437-441.
26. Walcott, R. R. 2008. Integrated pest management of bacterial fruit blotch of cucurbits. Pages 191-209 in: Integrated management of diseases caused by fungi, phytoplasma and bacteria, A. Ciancio and K. G. Mukerji, eds. Springer Netherlands.
27. Walcott, R. R., and Gitaitis, R. D. 2000. Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* in watermelon seed using immunomagnetic separation and the polymerase chain reaction. Plant Dis. 84:470-474.
28. Walcott, R. R., Langston, D. B., Sanders, F. H., and Gitaitis, R. D. 2000. Investigating intraspecific variation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* using DNA fingerprinting and whole cell fatty acid analysis. Phytopathology 90:191-196.
29. Willems, A., Goor, M., Thielemans, S., Gillis, M., Kersters, K., Ley, J. D., and De Ley, J. 1992. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov.,

comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. Int. J. Syst. Bact. 42:107-119.

台灣中南部瓜類作物與粉蝨中雙生病毒之監測與其基因體變異性分析

廖吉彥[1]、鄧汀欽[1]、林鳳琪[2]、黃莉欣[3]、彭瑞菊[4]、陳宗祺[5]、
賴儀瑾[6]、陳信宏[6]、宋明彥[6]、胡仲祺[6,7]

[1] 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組

[2] 行政院農業委員會農業試驗所應用動物組

[3] 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

[4] 行政院農業委員會台南區農業改良場

[5] 亞洲大學生物科技學系

[6] 國立中興大學生物科技學研究所

[7] 聯絡作者，電子郵件信箱：cchu@dragon.nchu.edu.tw

摘　　要

洋香瓜等瓜類作物極具經濟價值，然近年來迭遭數種新興病毒病害之大規模感染，造成農民的重大損失。其中由菸草粉蝨(*Bemisia tabaci* species complex)所傳播的南瓜捲葉病毒 *Squash leaf curl virus* (SqLCV，雙生病毒科)於台灣中、南部地區洋香瓜上造成捲葉病的肆虐，在 2008 下半年造成洋香瓜捲葉病害的大流行，甚而導致全園廢耕的嚴重經濟損失，成為洋香瓜產業的主要限制因子之一。亟需開發方便有效的方法，以監測 SqLCV 於粉蝨與作物中的帶毒與感染狀況，預作適當之防治工作。本研究研發利用滾環式擴增法(Rolling Circle Amplification，RCA) 檢測雙生病毒環狀 DNA 的技術，持續於雲林、嘉義、與台南等縣市之主要瓜類作物栽培區進行 SqLCV 之監測。發現 SqLCV 普遍存在於田間瓜類作物與粉蝨族群中，但基因體變異性極大。且帶毒率與感染率隨作物種類而不同，其中以西瓜最低，洋香瓜最高。為進一步了解雙生病毒基因體在不同時空環境中的變異性，本研究分析比對自 2007 年至 2010 年不同時間點於台灣中南部分屬不同地理位

置的洋香瓜栽培區所採集的 SqLCV 基因體序列，並分別比對來自於洋香瓜葉片或粉蝨體內所選殖之 SqLCV 基因體序列，發現在不同時空環境下經常發生變異的核苷酸位置較常出現於基因間隙區域(intergenic region)與外鞘蛋白(coat protein)編碼區域中。而其他基因體區域相對較為穩定。不同的地理環境與瓜類作物對於雙生病毒的基因體序列亦有影響，此基因體序列之變異性亦可作為用於追蹤雙生病毒來源與設計有效病毒防治策略的參考工具。

關鍵詞： 瓜類作物、捲葉病害、雙生病毒、基因體、滾環式擴增法

緒　言

洋香瓜與甜瓜等瓜類為具有極高經濟價值的作物，也是台灣中南部許多鄉鎮(如將軍鄉、七股鄉等)的特色產物。然而由於台灣地區洋香瓜等瓜類作物主要的栽培區位於台灣中、南部地區，在氣候條件上屬於較為高溫的區域，極為適合病毒的媒介昆蟲(例如粉蝨、薊馬、蚜蟲等)之生長與繁殖。因此，病毒病害已成為近年瓜類作物栽培生產的主要限制因子之一。早在1980年，Lovisolo氏已統計出在瓜類作物上有25種病毒的感染[18]；而在台灣地區，於2005年前已在瓜類作物上發現有七屬的病毒，分別為 *Luteovirus*、*Tobamovirus*、*Cucumovirus*、*Potyvirus*、*Tospovirus*、*Comovirus*、與*Begomovirus* [3]。自2006年以來，陸續有屬於*Tospovirus*、*Begomovirus*、與*Crinivirus*等屬的植物病毒輪流造成嚴重危害，部分瓜田可達全園廢耕的程度，導致鉅大的經濟損失[1,13]。

在近年流行於台灣中南部地區的瓜類病毒中，*Begomovirus*屬的雙生病毒(geminiviruses)是較為特殊的植物病毒。雙生病毒具有一條(稱為DNA A)或兩條(分別稱為DNA A與DNA B)的環狀單股DNA基因體，可在多種重要的農藝、園藝、蔬菜、與纖維作物上造成嚴重感染。在近年來RNA基因體的植物病毒已經陸續發現或育成抗病毒作物的情況之下，具有DNA基因體的雙生病毒已經成為世界上最具有經濟重要性的植物病原之一。

*Begomovirus*屬的雙生病毒在近幾年於台灣中、南部地區洋香瓜上造成捲葉病的肆虐，並在2008下半年造成洋香瓜捲葉病害的大流行，極具有經濟重要性。洋香瓜捲葉病的病原主要為雙生病毒科中的南瓜捲葉病毒(*Squash leaf curl virus*，簡稱SqLCV)。洋香瓜苗在定植初期遭SqLCV感染後，會出現嚴重的葉片捲曲病徵(如圖一所示)，通常為向下捲曲，心葉捲曲情形更為明顯，瓜藤節間縮短，生長停滯，開花、授粉、與結果均受到干擾，嚴重時甚而導致全園無收成的經濟損失。*Begomovirus*屬的雙生病毒由粉蝨(*Bemisia tabaci* species complex)所傳播(如圖二所示)。因粉蝨逐漸適應台灣的農作物生態，並且已對於幾種常用的殺蟲劑(如益達胺等新尼古丁類藥劑)產生抗藥性，在台灣地區的發作密度亦日漸升高，必須密切注意防範。

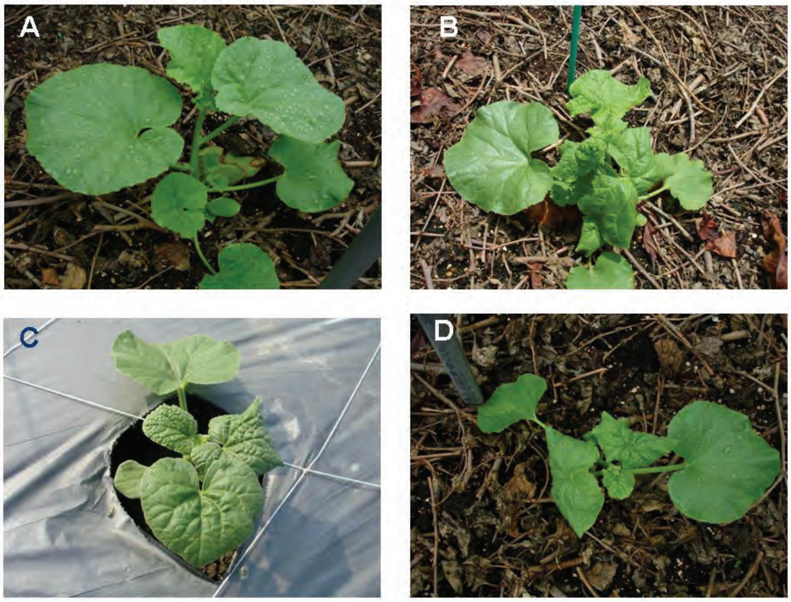
“預防”對於植物病毒病害之防治是最為經濟與有效的策略。利用抗病毒品種、使用健康種苗，並須密切監控媒介昆蟲的棲群密度及帶毒率，以防範田間的病害散佈，才能達到事半功倍的效果。而這類預防工作的成功關鍵，則在於種苗的病毒檢測、栽植初期的病害與粉蝨防治、及帶毒率監控措施。早期發現並確認感病的苗株，可以及早加以拔除，並補植健康苗株，可節省大量的農藥、肥料、與人工費用，並可以移除田間的初級接種源(Primary inoculum)，避免病害傳播。

圖一、定植初期之健康洋香瓜植株(左)，及遭受*Squash leaf curl virus* (SqLCV)感染的洋香瓜植株(右)。感病之洋香瓜植株心葉與營養葉出現明顯的向下捲曲(如箭號所示)。

Fig. 1. Healthy (left) and *Squash leaf curl virus* (SqLCV)-infected muskmelon plants at early stage after setting. Notice that the young buds and leaves of the SqLCV-infected plant show severe downward curling symptoms (as indicated by the arrows).

圖二、粉蝨(*Bemisia tabaci*)為SqLCV之媒介昆蟲，性喜於洋香瓜葉片背面取食與繁殖。農民與監測工作人員必須經常檢視葉片背面，以期提早發現粉蝨的危害與及時進行防治工作。
Fig. 2. The whitefly (*Bemisia tabaci*) is the vector of SqLCV. Whiteflies are usually found feeding and mating on the back side of the leaves. Growers and monitoring workers are advised to frequently check the back side of leaves for the infestation of whiteflies and take prompt actions to prevent the spread of the disease.

然而，對於病毒病害而言，有許多生理因子或環境條件會造成類似病毒感染的病徵，例如洋香瓜苗株定植初期，可能因為土壤鹽分較高或農民使用生長激素等因素而造成類似SqLCV感染病徵的心葉捲曲、節間縮短等現象(如圖三所示)，但是以靈敏度極高的聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction, PCR)卻無法檢測出病毒DNA，此類病徵通常在環境條件改善後，即可在數天內恢復正常生長。而有些植株，看似無病徵，但是卻屬於病毒潛伏性感染，會在開花後無法揹果或產生低品質的畸形果。因此，亟需研發高靈敏度、高專一性、且方便使用的病毒檢測方法，以利種苗病毒檢測、與媒介昆蟲帶毒率監測等相關工作之進行。



圖三、定植初期出現類似SqLCV感染病徵之洋香瓜植株。疑似感染的植株並未檢測出SqLCV之病毒DNA，且植株在約一週後恢復正常生長。
Fig. 3. Muskmelon plants showing leaf curling symptoms similar to those caused by SqLCV infections at early stage after setting. The symptom-less plantlet (A) was found to be infected by SqLCV and developed severe symptoms at later stages. However, the symptomatic muskmelon plantlets showing downward leaf curling symptoms (B, C, and D) were SqLCV-free, and recovered to normal phenotype after about one week.

此外，抗病育種與病毒檢測監控技術的研發皆需基於對病毒基因體變異性的了解。雙生病毒之基因體具有極高的變異性[7,9,12,19]。Duffy 與 Holmes(2008)長期追蹤感染番茄的*Tomato yellow leaf curl virus*(TYLCV)的基因體變異性，推算出TYLCV基因體DNA的變異速率為每個核苷酸位置每年發生2.88 x 10^{-4}次的變異。這些快速變異的基因體序列，可改變病毒的致病性、與寄主範圍，突破目前所使用的抗病品種，並使雙生病毒得以逃避依賴專一性病毒檢測法之偵檢。而目前對於感染瓜類作物的雙生病毒之基因體變異性與其變異速度，則仍尚待吾人之深入探討。

因此，本研究的主要目標為改良與建立檢測葉片與粉蝨中SqLCV之標準操作流程，並進一步應用此技術監測台灣地區洋香瓜上SqLCV之感染狀

況及其媒介昆蟲中之帶毒率，以作為設計病毒病害防治策略之重要依據。期望能協助上級指導單位與相關工作人員確實掌握重要病毒病害的發生情況、流行病趨勢、以及病毒基因體與致病性的變異情形，並進而發展瓜類作物雙生病毒病害的有效防治策略。

材料與方法

瓜類作物葉片樣本與粉蝨樣本之採集

自台灣中南部洋香瓜與甜瓜主要產地 (台南市安南區、台南縣七股、佳里、將軍、仁德、彰化縣溪湖、雲林縣二崙、崙背等地區)選定小區域採樣區，參考林等(1997)之研究方法，自洋香瓜栽培田中採集瓜葉與粉蝨樣本，以徒手翻葉法使用吸蟲器採集粉蝨。

植物與單一粉蝨總量DNA萃取

將前項採集之葉片樣本撕取0.1g之葉片組織(含有主葉脈者為佳)或單一隻粉蝨樣本放置於Eppendorf小管，以Eppendorf研磨器磨碎，並加入100μl之DNA萃取緩衝液(10mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1%, Triton X-100) [11]於管中，置於60℃之乾浴加熱器處理5分鐘後，再加入等體積的Phenol (pH 8.0)進行DNA萃取。經離心分層後，吸取上清液，加入2.5倍體積的95%酒精，混合後進行低溫酒精沉澱。所得的DNA沉澱物經真空乾燥後，溶解於20μl的去離子水中，作為後續檢測反應之模板。

滾環式擴增法(Rolling circle amplification, RCA)

由於雙生病毒本身即具有環狀單股DNA，極為適合作為RCA的模版，因此本研究參考Inoue-Nagata 等人(2004)及Haible等人(2006)的方法，以RCA方法進行SqLCV基因體DNA的檢測。本方法不需事先知道病毒的基因體序列資訊，僅需採用6-mer逢機引子對，即可利用Phi29 DNA polymerase的DNA鏈取代特性於恆溫條件(30℃)下進行環狀複製與擴增作用。特別適用

於基因體變異迅速的雙生病毒之偵測。增幅的產物並進一步利用限制酵素*Bam*HI、*Eco*RI、與*Pst*I進行截切，並配合洋菜膠體電泳[23]分析增幅之產物。

南方墨點雜合法(Southern blot hybridization)

由於RCA方法會增幅環狀的DNA分子，不僅限於雙生病毒DNA，因此為確認由RCA所增幅之產物的確來自於雙生病毒基因體模版，本研究進行南方墨點雜合法分析[23]。所使用的探針為利用聚合酶鏈反應以Digoxigenin(DIG)標定之SqLCV外鞘蛋白基因編碼區域。由於探針在高嚴苛度(High stringency)條件下，可辨認具有90%序列相似度的DNA分子，故仍可用於確認已產生變異的SqLCV基因體DNA。

病毒基因體DNA序列分析

自植物葉片或粉蝨中所擴增得到的雙生病毒DNA，以適當之限制酵素(如BamHI)切割後，選殖於載體pUC119之相對切位。每一樣本選取至少二個樣本進行DNA定序(源資生物科技公司、明欣生物科技公司)。所獲得之雙生病毒基因體序列利用GCG套裝軟體(version 11.1.3, Accelrys Inc.)中的之預設參數及條件，以Gap與BestFit程式進行兩兩序列比對，並以PileUp與PaupSearch進行多重序列比對與親緣演化分析。除了本研究所定序的台灣中南部地區洋香瓜與粉蝨體內之SqLCV分離株外，本研究並自GenBank[4]選取不同地理區域的SqLCV代表性株系，已進行親緣演化分析。所使用的株系與其GenBank擷取碼(Accession number)顯示於圖說明中。

結果與討論

以滾環式擴增法檢測雙生病毒DNA

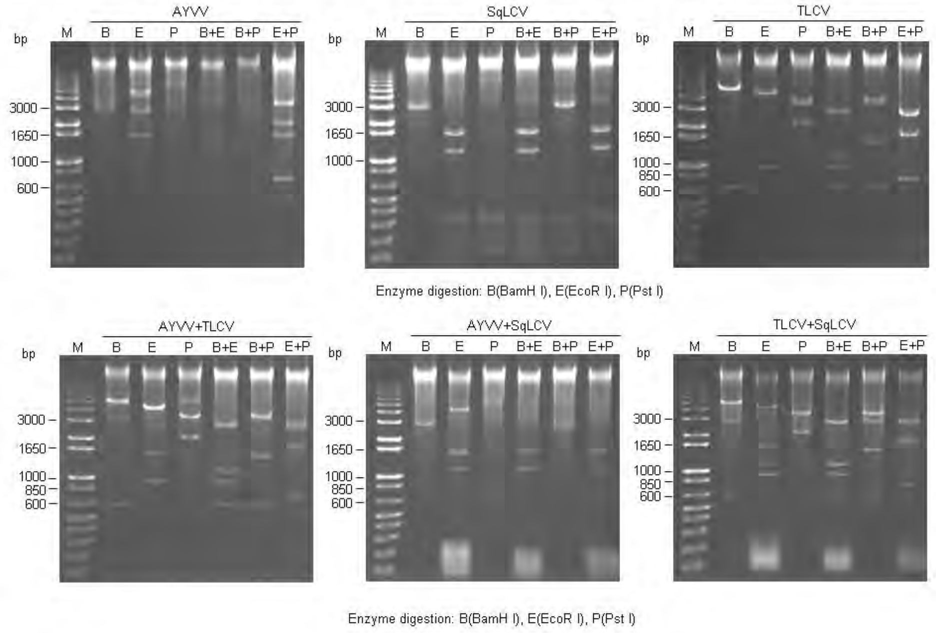
本研究主要目標為針對基因體DNA快速變異的雙生病毒，研發方便、靈敏、準確的檢測方法，並探討雙生病毒DNA序列在洋香瓜植株上或粉蝨體內的實際變化情形。

如前述，由於雙生病毒DNA序列變異極大，不適合使用需要事先知道待測目標DNA序列的檢測方法(例如聚合酶鏈反應等)，且因雙生病毒基因體為單股環狀DNA，極為適合直接作為RCA的模板，因此本研究參考Inoue-Nagata 等人(2004)及Haible等人(2006)的方法，以RCA作為檢測瓜類作物雙生病毒的工具。而為區別SqLCV與其他雙生病毒的可能複合感染，本研究將RCA產物以限制酵素*Bam*HI、*Eco*RI、*Pst*I截切，並以洋菜膠體電泳分析其產物。所使用的他種雙生病毒為田間雜草上常見的霍香薊黃脈病毒(*Ageratum yellow vein virus,* AYVV)與農民栽植於田邊的番茄上經常發現的番茄捲葉病毒(*Tomato leaf curl virus*, TLYV)。以測試RCA方法的專一性。所得結果如圖四所示，以RCA方法配合三種不同的限制酵素截切，每種病毒均有其特異性的DNA圖譜，即使在複合感染的情況下，亦能由特異性的DNA圖譜明顯區別不同雙生病毒DNA的存在。

以南方墨點雜合法確認RCA法增幅之DNA條帶

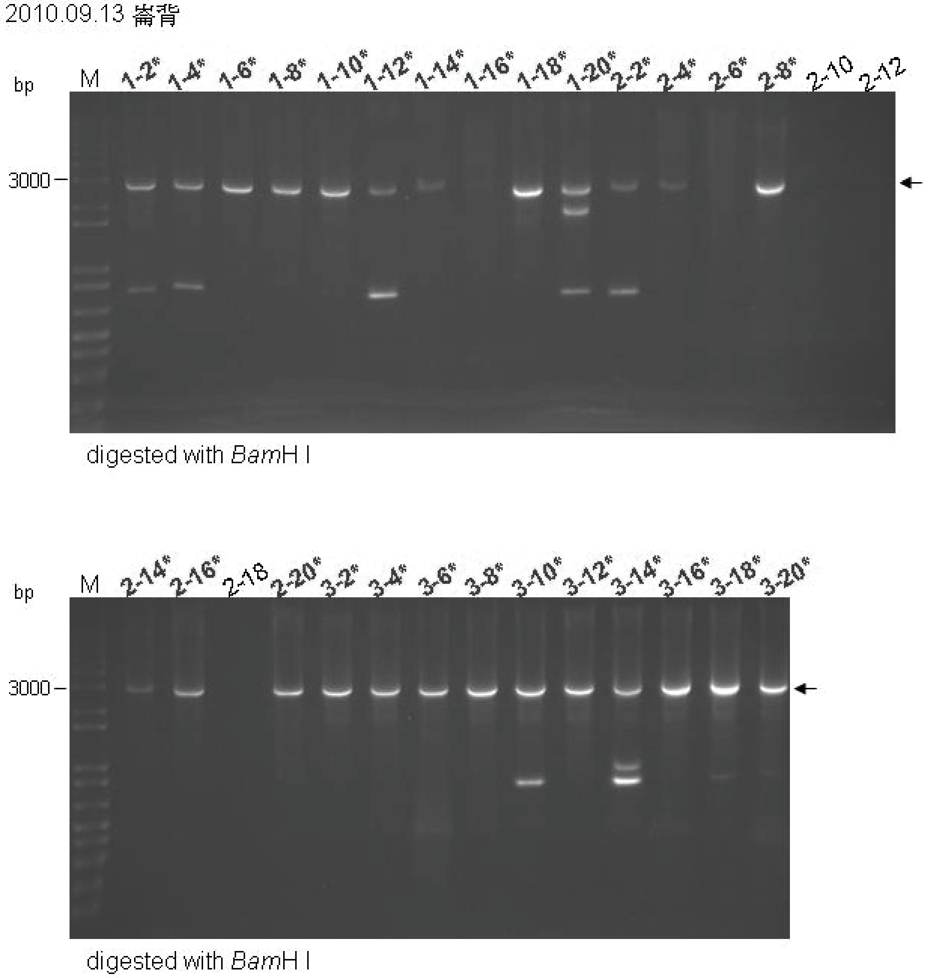
由上述實驗可知RCA法確實可適用於瓜類雙生病毒的檢測工作。本研究亦自2006年起即採用RCA法進行瓜類作物與粉蝨媒介昆蟲體內雙生病毒的監測工作。檢測的代表性結果如圖五所示，經RCA配合限制酵素*Bam*HI截切後，可在約3000 bp的位置，觀察到雙生病毒DNA A的全長基因體(圖五，箭號所指處)，並可於後續工作中直接將SqLCV全長DNA A選殖於載體中，進行核酸序列的解析與比對。

然而，在檢測過程中，經常發現除了3000 bp位置出現的全長DNA A條帶之外，會出現長度約為1000~2000 bp的DNA條帶，干擾檢測結果的判讀。由於RCA會增幅環狀DNA模板，因此植物組織或粉蝨體內的葉綠體、粒線體、或細菌的基因體與質體(plasmid DNA)皆有可能被RCA增幅，因此，為確認RCA增幅DNA條帶之正確性，本研究採用Southern blot analysis，以SqLCV外鞘蛋白基因的編碼區域作為探針，進行雜合分析。結果如圖六所示，僅有位於3000 bp位置或接近3000 bp的DNA條帶才可與探針雜合，其餘的小分子DNA條帶均不屬於SqLCV。因此，RCA法配合南方墨點雜合法分析，可正確檢測並區別瓜類作物中雙生病毒之存在。



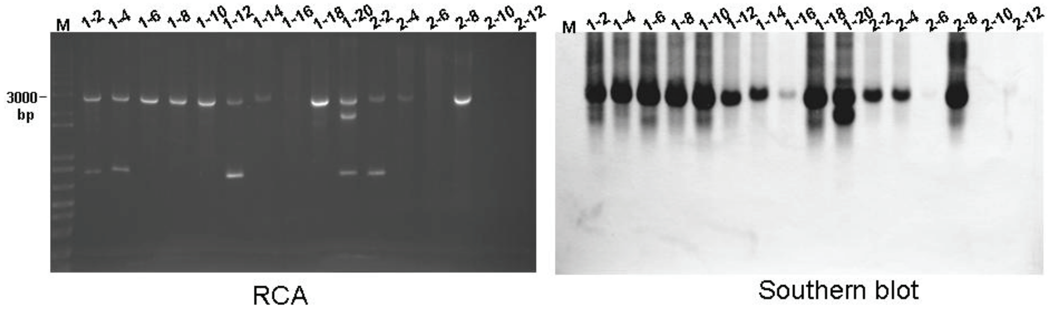
圖四、以滾環式擴增法(Rolling circle amplification, 簡稱RCA)配合三種不同限制酵素(*Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I)的剪切以檢測並區別不同種雙生病毒[霍香薊黃脈病毒(*Ageratum yellow vein virus*, AYVV)，南瓜捲葉病毒(*Squash leaf curl virus*, SqLCV)，與番茄捲葉病毒(*Tomato leaf curl virus*, TLCV)]的單獨或複合感染。

Fig. 4. Detection and differentiation of different geminiviruses by Rolling cirucle amplification coupled with restriction digestion analysis. Total DNAs extracted from plants infected singly with Ageratum yellow vein virus (AYVV), Squash leaf curl virus (SqLCV), or Tomato leaf curl virus (TLCV), or doubly with either two of the three viruses, as indicated on top of each panel, were subjected to RCA reactions according to Haible et al. (2006), followed by restriction digestion with *Bam*HI (B), EcorI (E), and PstI (P), as indicated on top of each lane, and agarose gel electrophoresis. The gels were then stained with Ethidium Bromide (EtBr) and visualized by UV illumination. The expected position of full-length SqLCV DNA A was indicated by the arrows. Molecular size markers (M) and the position of representative maker DNA band were as indicated.



圖五、以滾環式擴增法(RCA)擴增雙生病毒環狀DNA基因體，並配合*Bam*HI限制酵素檢測雲林縣崙背鄉洋香瓜葉片樣本中雙生病毒感染率之代表性結果。SqLCV全長基因體DNA預期出現的位置標示於圖右方(箭號所示)，分子量標準品(M)與3000 bp條帶之位置標示於圖左方，感染SqLCV之樣本編號以紅色字體加星號表示。

Fig. 5. Detection of SqLCV circular genomic DNAs by Rolling circle amplification (RCA) plus restriction enzyme digestion. Total DNAs extracted from muskmelon leaf samples were subjected to RCA reactions according to Haible et al. (2006), followed by restriction digestion with *Bam*HI and agarose gel electrophoresis. The gels were then stained with EtBr and visualized by UV illumination. The expected position of full-length SqLCV DNA A was indicated by the arrows. Molecular size markers (M) and the position of 3000 bp DNA band were as indicated. The identities of each sample were indicated on top of each lane. Samples infected with SqLCV were shown with red fonts plus a star sign, *.



圖六、以南方墨點雜合法確認RCA偵測法之可信度。

Fig. 6. Confirmation of results of Rolling Circle Amplification (RCA) by Southern blot analysis. Total DNAs extracted from muskmelon leaf samples were subjected to RCA analysis [11], followed by digestion with the restriction enzyme BamHI. The reactants were analyzed by electrophoresis through a 1 % agarose gel and visualized by eithidium bromide staining and UV illumination (Left panel). The same gel were then subject to Southern blot analysis using DIG-labeled DNA probes specific to DNA A of SqLCV (Right panel). The identities of each sample were indicated on top of each lane. M, molecular size marker (1kb Ladder, New England BioLab). The expected position of the full-length DNA A component of Squash leaf curl virus was indicated by the arrows on the right.

目前各研究單位普遍採用之植物病毒檢測方法包括酵素連結免疫吸附法(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)、免疫擴散沉澱法(Immuno-diffusion)、聚合酶鏈反應法(Polymerase chain reaction, PCR)、光學、與電子顯微鏡檢測法、或核酸探針及各式墨點法(Southern blot, northern blot, western blot analyses)等，在操作之速度及簡便性、試劑之敏感性與專一性、經濟性等方面均仍有極大之改進空間，且因雙生病毒在植物中含量低，以傳統檢測方法極難偵測雙生病毒。在有限的幾個血清偵測的例子，均顯示很高的交互反應，而無法區分相近或相遠的病毒。直到核酸分子選殖、核酸雜配及聚合酵素連鎖反應、核酸定序比對等分子生物學技術的應用，雙生病毒才能被準確的偵測和鑑定[6,8,10,15,20,25]。在國內，農業試驗所的關博士研究團隊亦研發出利用LAMP(Loop-mediate isothermal amplification)技術以快速檢測SqLCV (Kuan et al., 2010)這些技術也同時能回答這些病毒的流行病學及遺傳岐異度及分子演化的關係，但是其相對價格、操作困難

度、與實驗室所需設備價格(如PCR溫度循環設備)均較為高昂，且受限於必須事先知道待測物的核酸序列以設計合成引子或探針，較不利於應用在基因體DNA快速變化的雙生病毒之檢測。而本研究採用的RCA法配合限制酵素截切與南方墨點雜合分析，在步驟上雖較為複雜，但其反應皆可在恆溫下進行，且較不受病毒DNA點突變的影響，亦不需事先得知檢測標的物的DNA序列，在操作方便性與結果的正確性極靈敏度方面，具有較大的優勢。

應用RCA法進行瓜類作物與粉蝨體內雙生病毒之間測工作

本研究應用上述所研發的RCA方法進行台灣中南部地區瓜類作物SqLCV感染率與粉蝨體內SqLCV帶毒率的監測工作。其中2010年1月至10月在雲林縣二崙與崙背鄉等栽培區的監測工作結果，整理統計後呈現於表一。經由田間監測與調查工作，發現雲林地區全年均有大面積的洋香瓜或甜瓜的種植。因此SqLCV全年可以持續存在於田間瓜類作物或粉蝨體內，並可在冬季裡作時台南地區開始栽培洋香瓜時，經由北風往南吹襲，即成為台南地區瓜田的初級感染源。因此SqLCV在台灣地區已經成為類似風土病害，無法採用Salati等人(2002)在多明尼加共和國所採行的辦法，經由長時間(三個月以上)清除茄科作物，而有效降低番茄捲葉病害危害。

另外，此監測工作亦發現越瓜(*Cucumis melo* var. *conomon*)與冬瓜(*Benincasa hispida*)感染SqLCV的感染率極高，而此二作物在田間係長時間(數月)栽培，因此極可能為SqLCV的越冬宿主(Reservoir hosts)，在洋香瓜等作物收成後，提供SqLCV持續複製。而在所有檢測的瓜類作物中，西瓜(*Citrullus vulgaris*)的SqLCV感染率最低。

SqLCV基因體DNA序列親緣關係分析

為明瞭台灣地區SqLCV之可能來源及其與世界其他地區瓜類雙生病毒間的親緣關係。本研究自GenBank基因庫[4]中選擇30株世界各地區已知感染瓜類作物的雙生病毒之基因體DNA A全長序列，與本研究於2006至2010年期間選殖並定序的57株SqLCV基因體DNA A全長序列，進行親緣關係分

析。結果如圖七所示，SqLCV基因體序列之分群與其地理位置有極大的關聯性，台灣地區所分離到的SqLCV株系，不論寄主植物，幾乎全部屬於相同的分群。僅有二株(99-03-el-3-2, 99-03-el-3-9)被歸類於東南亞的分群，顯示在台灣地區的SqLCV已經成為本土性的病毒株系，可與外國株系明顯區別。

表一、2010 年 1 月至 9 月期間南瓜捲葉病毒(*Squash leaf curl virus*)於二崙、崙背地區瓜類作物感染率與粉蝨帶毒率之監測結果統計表

Table 1. Incidence of *Squash leaf curl virus* infections in various cucurbits and viruliferous ratio of whiteflies in Erlun and Lunbei areas from January to September, 2010.

Crop species	Leaf samples			Whitefly samples		
	Total number	RCA (+)	Disease incidence	Total number	RCA (+)	Viruliferous ratio
Cucumis melo var. *reticulatus* (洋香瓜)	740	489	66.1%	669	245	36.6%
Citrullus vulgaris (西瓜)	190	37	19.4%	100	16	16%
Cucumis melo var. *Makuwa* (香瓜)	30	16	53%	10	7	70%
Cucumis melo var. *conomon* (越瓜)	40	37	92.5%	10	2	20%
Benincasa hispida (冬瓜)	30	22	73.3%	ND	ND	ND

圖七、台灣中南部地區採集的SqLCV基因體DNA A 核酸序列與GenBank基因庫(Benson et al., 2010)中各地區瓜類雙生病毒基因體DNA A代表性序列之親緣關係分析。

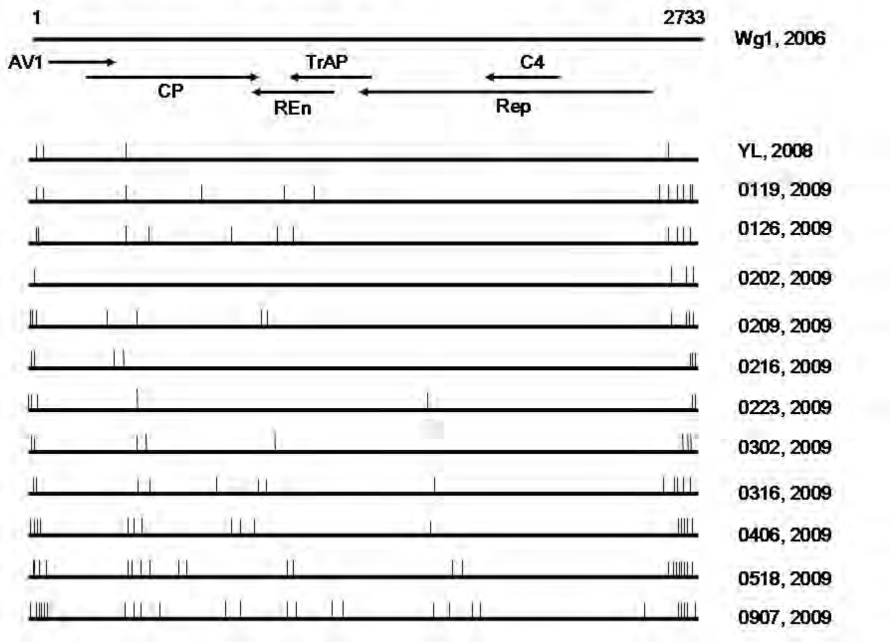
Fig. 7. Complete DNA-A sequences of 30 representative geminiviruses isolated from cucurbits were retrieved from GenBank [(4)] and used in the phylogenetic analysis with those of 57 local isolates collected during 2006 to 2010 period. The programs PileUp and PaupSearch in the GCG Package (Accelrys Inc.) were used in the phylogenetic analyses using default parameters. The “distance” criterion was used in the reconstruction and evaluation of the phylogenetic tree. The names, accession numbers, species (abbreviations), and the locality of sequences, respectively, were listed as the following: P133.seq, EU487041, *Squash leaf curl Philippines virus* (SqLCPV) isolate P133, Philippines; P88.seq, EU487033, SqLCPV isolate P88, Philippines; P54.seq, EU487031, *Squash leaf curl China virus* (SqLCCNV) isolate P54, Philippines; Wg1.seq, EU310406, *Squash leaf curl Philippines virus* isolate Wg1, Taiwan;JD.seq, EF532620, *Squash leaf curl virus* (SqLCV), Jordan; YL.seq, EU479710, SqLCV isolate YL, Yunlin, Taiwan;VNB.seq, NC_007339, SqLCCNV-[B], Viet Nam; In.seq, EU573715, *SqLCCNV*- [Pumpkin:Varanasi], Northern India; USCA.seq, DQ285014, *Squash mild leaf curl virus* isolate 4, California, USA; USCA-R.seq, AF421552, *Squash mild leaf curl virus*-[Imperial Valley], California, USA; USNB.seq, AF110189, *Bean calico mosaic virus*, Nebraska, USA; Idc.seq,

AY184487, SqLCCNV -[Pumpkin:Coimbatore], India; USCA10.seq, DQ285016, SqLCV isolate 10, Imperial Valley, California, USA; VNB2.seq, AF509743, SqLCCNV -[B], Viet Nam; VNK.seq, AF509741, SqLCCNV -[K], Viet Nam; US-1990.seq, M38183, SqLCV, USA; USNB2.seq, NC_003504, *Bean calico mosaic virus*, Nebraska, USA; USCA-3.seq, NC_004645, *Squash mild leaf curl virus*-[Imperial Valley], California, USA; US-1991b.seq, NC_001936, SqLCV, USA; Phili.seq, AB085793, SqLCPV, Philippines; Id4.seq, DQ026296, SqLCCNV -[Pumpkin: Lucknow], North India; MC1.seq, EF197940, SqLCCNV isolate MC1, Malaysia; AFPK.seq, EF199774, SqLCPV -[Taiwan] isolate AFPK5slv, Shanhua, Taiwan; PA1-TWTn.seq, DQ866135, SqLCPV isolate PA1, Tainan, Taiwan; G25.seq, AM260206, SqLCCNV isolate G25, China; Hn61.seq, AM260205, SqLCCNV isolate Hn61; Egypt.seq, DQ285019, SqLCV isolate Cairo, Egypt; WAZ.seq, AF256203, SqLCV strain SLCV-WAZ, Arizona, USA; CN-Bg.seq, AB027465, SqLCCNV, China. For isolates identified in this study, two- or four-digit numbers were used to identify the year (in Republic of China Calendar year) or the month and date (isolated in year 2009) of collection of each isolate, respectively. The length of the scale bar represents the distance of 0.1 substitutions per site.

SqLCV基因體變異性分析

為了解SqLCV基因體之變異性，本研究持續自台南地區的定點採樣田採集SqLCV樣本，進行選殖與定序分析。經與廖等人(2007)所首次發現的台灣SqLCV-Wg1序列進行比對分析，發現每週所採集的樣本即有約1~2%的核苷酸變異，變異速度極為快速，遠高於Duffy 與Holmes(2008)所報導的TYLCV之變異速度。而在不同時空環境下經常發生變異的核苷酸位置較常出現於基因間隙區域(intergenic region)與外鞘蛋白(coat protein)編碼區域中。而其他基因體區域相對較為穩定。

雙生病毒基因體具有極高的變異性[7,9,12,19]。且在變異後，可逃避某些專一性的檢測方法之偵檢，並可能出現具有高度致病性、或可突破當前抗病品種的突變病毒株系，並因而造成新流行病害的大發生[5,7,21,24,26]。因此，防檢疫工作相關單位必須持續注意此種病毒基因體DNA快速變化的情形。



圖八、SqLCV基因體DNA A序列之變異性分析。於2009年洋香瓜栽培季節持續追蹤、比對分析自台南地區固定監測田所採集的SqLCV樣本之基因體DNA A核酸序列，以明瞭SqLCV基因體之變異性。

Fig. 8. Temporal variations of nucleotide sequences of SqLCV genomic DNA A component. During the 2009 growing seasons of muskmelons, SqLCV samples were continuously collected from the same location in Tainan. The nucleotide sequences of DNA A component of each sample were compared to those of the reference sequences of SqLCV-Wg1 (shown on top of the figure, with the positions and translational directions of each gene indicated by the arrows) and SqLCV-YL, using the Gap program in the GCG Package (Accelrys Inc.). The numbers on the right of each sequence indicate the month, date, and year of the collection. Differences with the reference sequence SqLCV-Wg1 were indicated by the vertical bars.

結論與展望

本研究已研發以RCA方法檢測微量樣本中雙生病毒基因體DNA的標準操作程序。此方法在防檢疫相關工作的應用性，包括下列數方面:1.用於區別真正病毒感染或是由非生物因子(Abiotic factors)所造成的病徵。可提供栽

種者資訊，以決定是否需要及早將可疑植株拔除；2.可協助追蹤病害或蟲害之防治成效，並進而減少用藥次數，降低生產成本；3.可協助農民選擇適合種植的地點與時間，並了解田間附近的可能感染源；4.協助政府相關單位及民意代表隨時掌控田間病毒病害流行之狀況。

SqLCV普遍存在於田間瓜類作物與粉蝨族群中，但基因體變異性極大，其變異速度亦即快速，大於TYLCV之變異速度。而粉蝨的帶毒率與植株感染率隨作物種類而不同，其中以西瓜最低，但越瓜與冬瓜即可能擔任越冬寄主的角色。

SqLCV基因體之變異，較常出現於基因間隙區域(intergenic region)與外鞘蛋白(coat protein)編碼區域中。而其他基因體區域相對較為穩定。此種變異對於診測方法與抗病品種的開發，具有極大的影響。

預期本研究的結果將可應用於洋香瓜等瓜類作物的抗病育種與栽培管理工作，作為用於追蹤雙生病毒來源與設計有效病毒防治策略的參考工具，並增進洋香瓜產業之經濟效益。

謝 辭

本研究工作承蒙行政院農業委員會動植物防疫檢疫局計畫” 98農科-9.3.1-檢-B2(5)、98農科-9.1.2-檢-B1(5)、99農科-9.1.2-檢-B1(Z)”經費支持，以及雲林縣二崙鄉廖英旭先生、崙背鄉李應期先生、台南縣將軍鄉農會吳明成股長、黃萬預先生、台南市農會林重興理事等人與許多相關單位同仁提供寶貴意見與實驗上的協助，特此致上無限謝忱。

引用文獻

1. 王堂凱，彭瑞菊，鄭櫻慧。2007。台灣洋香瓜田間病毒相動態及媒介昆蟲帶毒率分佈之流行病學研究。行政院及所屬各機關出國報告。
2. 林鳳琪、蘇宗宏、王清玲。1997。溫度對銀葉粉蝨發育與繁殖之影響及其在聖誕紅上之發生。 中華昆蟲17: 66-79。

3. 鄧汀欽，蔡錦慧，廖吉彥。2005。瓜類種子傳播病毒病害的特性。植物種苗 7:1-19。
4. Ali, M., Z. Ahmad, M. Tanveer, and T. Mahmood. 1995. Cotton Leaf Curl Virus in the Punjab. Current Situation and Review of Work. Multan, Pakistan: Cent. Cotton Res. Inst./Pak. Minist. Food, Agric. Livest./Asian Dev. Bank. 117pp.
5. Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. & Sayers, E. W. 2010. GenBank. Nucleic Acids Res 38: D46-51.
6. Briddon, R. W., Prescott, A. G., Lunness, P., Chamberlin, L. C. L.,and Markham, P. G. 1993. Rapid production of full-length, infectious geminivirus clones by abutting primer PCR(AbP-PCR). J. Virol. Methods 43:7-20.
7. Bull, S. E., R. W. Briddon, W. S. Sserubombwe, K. Ngugi, P. G. Markham, and J. Stanley. 2006. Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic viruses in Kenya. J Gen Virol. 87:3053-65.
8. Caciagli, P., and Bosco, D. 1997. Quantitation over time of tomato yellow leaf curl geminivirus DNA in its whitefly vector. Phytopathology 87:610-613.
9. Duffy, S. and Holmes, E. C. 2008. Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus Tomato yellow leaf curl virus. J. Virol. 82:957-65.
10. Gilbertson, R. L., Hidayat, S. H., Martinez, R. T., Leong, S. A., Faria, J. C., Morales, F., and Maxwell, D. P. 1991. Differentiation of bean-infecting geminiviruses by nucleic acid hybridization probes and aspects of bean golden mosaic in Brazil. Plant Dis. 75:336-342.
11. Haible, D., Kober, S., Jeske, H. 2006. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. J. Virol. Methods 135:9-16.

12. Harrison, B. D., and D. J. Robinson. 1999. Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (begomoviruses). Annual Review of Phytopathology. 37:369-98.
13. Huang, L. H., Tseng, H. H., Li, J. T., and Chen, T. C. 2010. First Report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* Infecting Cucurbits in Taiwan. Plant Dis. 94:1168.
14. Inoue-Nagata, A. K., Albuquerque, L. C., Rocha, W. B., and Nagata, T. 2004. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage phi29 DNA polymerase. J Virol Methods 116: 209-11.
15. Kuan, C. P., Wu, M.T., Lu, Y. L., and Huang H. C. 2010. Rapid detection of squash leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification. J. Virol. Methods 169:61-65.
16. Liao, J. Y., Hu, C. C., Lin, T. K., Chang, C. A., and Deng, T. C. 2007. Identification of Squash leaf curl Philippines virus on *Benincasa hispida* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 16, 11-18.
17. Legg, J. P., and C. M. Fauquet. 2004. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. Plant Mol Biol. 56:585-99.
18. Lovisolo, O. 1980. Virus and viroid diseases of cucurbits. Acta Horticulturae 88:33-82.
19. Nawaz-ul-Rehman, M. S., and C. M. Fauquet. 2009. Evolution of geminiviruses and their satellites. FEBS Lett. 583:1825-32.
20. Navot, N., Ber, R., and Czosnek, H. 1989. Rapid detection of tomato yellow leaf curl virus in squashes of plants and insect vectors. Phytopathology 79:562-568.
21. Pita, J. S., V. N. Fondong, A. Sangare, G. W. Otim-Nape, S. Ogwal, and C. M. Fauquet. 2001. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. J Gen Virol. 82:655-65.

22.Salati, R., Nahkla, M. K., Rojas, M. R., Guzman, P., Jaquez, J., Maxwell, D. P., and Gilbertson, R. L. 2002. Tomato Yellow leaf curl virus in the Dominican Republic: Characterization of an infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. Phytopathology 92:487-496.

23. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. A. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York.

24. Thresh, J. M., G. W. Otim-Nape, J. P. Legg, and D. Fargette. 1997. African cassava mosaic virus disease: the magnitude of the problem. Afric. J. Root Tuber Crops. 2:13-19.

25. Wyatt, S. D., and Brown, J. K. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. Phytopathology 86:1288-1293

26. Zhou, X., Y. Liu, L. Calvert, C. Munoz, G. Otim-Nape, D. Robinson, and B. Harrison. 1997. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. J Gen Virol. 78:2101-2111.

ABSTRACT

Survey of incidences and analysis of genomic variations of Squash leaf curl virus in cucurbit crops in southern and central Taiwan

Jye-Yann Liao[1], Ting-Chin Deng[1], Feng-Chyi Lin[2], Li-hsin Huang[3], Jui-Chu Peng[4], Tsung-Chi Chen[5],Yi-Chin, Lai[6], Hsing-Hong Chen[6], Ming-Yen Song[6], and Chung-Chi Hu[6,7]

[1] Plant Pathology Division, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

[2] Applied Zoology Division, Agricultural Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

[3] Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan

[4] Tainan District Agricultural Research and Extension Station, Council of Agriculture, Executive Yuan.

[5] Department of Biotechnology, Asia University, Taiwan

[6] Graduate Institute of Biotechnology, National Chung-Hsing University

[7] Corresponding author, Email: cchu@dragon.nchu.edu.tw

Cucurbits are economically important crops in Taiwan. However, several emerging viral diseases have devastated the production of cucurbits and caused great losses in recent years. *Squash leaf curl virus* (SqLCV, Geus *Begomovirus* , Family *Geminiviridae*), transmitted by whiteflies (*Bemisia tabaci* species complex) is among the most severe viral pathogens in cucurbits. The development of efficient and convenient methods for the monitoring of SqLCV in cucurbits is in need. In this study, modified rolling circle amplification (RCA) method to detect the circular DNA genome of SqLCV was developed and applied in the survey of SqLCV in whiteflies and cucurbit crops in the major production areas in southern and central Taiwan. The results revealed the common and persistent presence of SqLCV among various cucurbit crops and whitefly populations. The disease incidences and viruliferous ratios varied

widely among different crops and whitefly populations, with watermelon and muskmelon being the lowest and highest, respectively. The spatial and temporal effects on the variations of SqLCV genomic sequences were further analyzed using samples collected from various localities in Taiwan over the period of 2007 to 2010. Most genomic variations were identified in intergenic region and coat protein coding sequences, while the Rep coding sequences were highly conserved. These results provide applicable references for the tracing of origins of SqLCV isolates and the design of effective disease management measures for SqLCV.

Key words：Cucurbits, leaf curl disease, geminiviruses, genome, rolling circle amplification

番椒病毒病害之發生與調查

鄭櫻慧[1,4]、陳金枝[1]、廖吉彥[1]、鄧汀欽[1]、林鳳琪[2]、詹富智[3]

[1] 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組

[2] 行政院農業委員會農業試驗所應用動物組

[3] 國立中興大學植物病理學系

[4] 聯絡作者，電子郵件信箱：YHcheng@tari.gov.tw

摘　　要

番椒（*Capsicum annuum* L., *C. frutescens* L.）主要分為甜椒和辣椒，為重要的茄科(*Solanaceae*)作物，台灣危害番椒病毒有 11 種之多，自 96 年起調查病毒在田間發生情形，甜椒樣本採集自露天栽培甜椒者，病毒發生率不高，各病毒檢出率差異不大，介於 6.0-10.5%之間。設施栽培者，potyvirus 的檢出率遠高於其他病毒，且出現病毒病徵植株常呈現區塊存在，疑似人為傳播所致。檢測的辣椒樣本中，除了 potyviruses，CMV 感染率最高，複合感染的比例高達 80.5%。地球暖化雨量分布不均，很容易造成小型昆蟲大量發生，尤其是媒介病毒傳播的薊馬和粉蝨。98 年在仁愛鄉採集 205 個番椒樣本，測到薊馬傳播的 TSWV 感染比例達 86.8%，99 年則降至 32.0%。調查中粉蝨傳播的 TYLCV 在番椒的感染率不高，鑒於其對番茄造成的嚴重危害，未來對番椒生產的影響亦須密切注意。

關鍵詞： 番椒、病毒、薊馬、粉蝨

緒　　言

番椒(*Capsicum annuum* L., *C. frutescens* L.)屬於茄科(*Solanaceae*)番椒屬(*Capsicum*)為一年生或多年生作物，主要分為甜椒(sweet pepper) 和辣椒(chili pepper)，原產於南美洲的秘魯和中美洲的墨西哥一帶。辣椒在台灣

栽培歷史悠久，臺灣甜椒栽培始於 1960 年之後由美國引進栽培[2]，夏季種植於中海拔地區，秋冬季則以中、南部地區栽培較多。目前主要栽培品種為一代交配種，品種依其果肉硬與柔軟分為「硬殼種」「軟殼種」，若依其果肉顏色區分，綠色以外顏色歸為「彩色甜椒」。台灣 98 年番椒栽培面積 2,290 公頃，產量達 25,301 公噸，主要栽培產區在屏東縣、高雄縣、台南縣、南投縣、雲林縣及嘉義縣等地，周年均有生產。

危害甜椒的病害主要有疫病、青枯病、細菌性斑點病、炭疽病、白絹病、白粉病、果實腐敗病、根瘤線蟲和病毒病害等[5]。番椒作物田間複合感染情形相當普遍[7, 20]，台灣已發生的病毒包括：煙草嵌紋病毒（*Tobacco mosaic virus*；TMV）、番茄嵌紋病毒（*Tomato mosaic virus*；ToMV）、番椒微斑駁病毒 (*Pepper mild mottle virus*；PMMoV)、胡瓜嵌紋病毒（*Cucumber mosaic virus*；CMV）、馬鈴薯病毒 Y（*Potato virus Y*；PVY）、番椒葉脈斑駁病毒(*Pepper veinal mottle virus*；PVMV) [15]，辣椒葉脈斑駁病毒(*Chilli veinal mottle virus*；ChiVMV) [30]、番茄斑點萎凋病毒（*Tomato spottd wilt virus*；TSWV）[34]、番椒褪綠病毒(*Capsicum chlorosis virus*；CaCV)和番茄黃化捲葉病毒（*Tomato yellow leaf curl virus*；TYLCV）[25, 29]。除了 TMV、ToMV 和 PMMoV 由機械傳播外，其餘病毒均可經由媒介昆蟲傳播，其中 CMV、PVY、PVMV 及 ChiVMV 可經由蚜蟲傳播，TSWV 和 CaCV 經由薊馬傳播[3]，番茄黃化捲葉病毒只經由銀葉粉蝨（*Besisia argentifolii*）傳播[1, 4]。

抗病育種為防治病毒病害最有效率的方法，抗病基因也成功利用育種方法導入辣椒、甜椒等重要作物。目前栽培甜椒品種常具有抗病基因如:L3 gene（抗 (耐) TMV）[8]、pvr2^1 與 pvr2^2（抗 (耐)PVY）[13]及 Tsw（抗(耐)TSWV）[11, 12, 23]，等，辣椒品種有抗 (耐) TMV，抗 (耐)CMV[16, 27]，抗病基因作用機制也逐漸闡明[31, 32]。

材料與方法

採樣

自民國96年起在南投、雲林、嘉義、花蓮及台東番椒栽培田採集疑似病毒病害樣本，每一栽培田逢機採樣6-10個樣品，其中TMV、ToMV、PMMoV、CMV、PVY、PVMV、ChiVMV和CaCV以血清進行酵素連結免疫分析，TSWV以西方漬染法分析，番茄捲葉病毒（TYLCV）以專一性引子對進行聚合酶連鎖反應（PCR）檢測。

間接酵素連結免疫分析 (Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

本試驗參照以往之研究報告進行[18]，使用之檢測抗體由實驗室自行製備。檢測時取 0.1 g 之罹病葉組織，以 3 mL 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 研磨均勻後，加入 ELISA 反應盤內，每樣品 2 個重複，置於 37℃生長箱 4 小時進行覆膜反應 (coating reaction)；然後以 1× PBST (137 mM NaC1, 1.5 mM KH_2PO_4, 1 mM Na_2HPO_4, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 緩衝液沖洗 3 次；其次加入病毒抗體後，放置在 37℃定溫箱反應 2 小時；再以 1× PBST 緩衝液沖洗 3 次後，加入已溶於磷酸緩衝液 (137 mM NaC1, 1.5 mM KH_2PO_4, 1 mM Na_2HPO_4, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 之山羊抗兔二級抗體 (Goat anti-Rabbit immunoglobin, Jackson, West Grove, PA, 100 µL/孔)，置於 37℃之定溫箱反應 2 小時；最後再以 1× PBST 緩衝液沖洗 4 次後，再以 150 µL/孔之比例加入濃度為 1 mg/mL 之鹼性磷酸酶酵素基質 (ρ-NPP, Amresco, Solon Ind., Ohio, USA) 進行呈色反應。反應 20 至 30 分鐘，以 ELISA 讀值儀 (PTI max micro plate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值，作為評估病毒濃度高低之依據。樣品讀值大於健康葉片之 2 倍者，視為正反應。

西方漬染法 (Western blotting)

取 0.1 g 之罹病葉組織，以液態氮磨碎後，加入 200 μL 之樣品處理液 (75 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 1mM EDTA, 30% glycerol, 6% SDS, 9% β-Mercaptoethanol, 0.015% Bromophenol blue)，研磨液加熱處理後經 SDS-PAGE 電泳後，膠體上之蛋白轉漬於 PVDF 膜 (Millipore Co., MA, USA)，之後以實驗室自行製備之 TSWV 病毒抗血清進行漬染反應。

聚合酶連鎖反應（Polymerase chain reaction；PCR）

取 100 mg 的病葉，利用基因體核酸純化試劑組 (Genomic DNA extraction kit, GenMark, Taiwan) 進行 DNA 之萃取。以純化所得之 DNA 進行聚合酶連鎖反應，25 uL 的反應液中加入 1 uL 的 DNA、各 2.5 μL 之 20 μM 簡併式引子或專一性引子對。PCR 之進行於熱循環反應儀 (GeneAmp model 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT) 中，設定反應程序為 94℃變性 1.5 分鐘；之後進行 30 個 PCR 循環反應：94 ℃下變性 1 分鐘，50 ℃下鍊合 1.5 分鐘，72 ℃下聚合 2 分鐘，最後一個循環之 72℃聚合反應延長為 6 分鐘。反應產物以 1.2% 電泳瓊膠 (SeaKem, Agarose, Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME USA) 進行分析。

感染番椒病毒病害調查結果

採集自南投、雲林、嘉義、花蓮及台東的甜椒及辣椒共計有 923 個樣本，檢測結果如表一。檢測病毒中以 PVMV 感染比例最高，達 30.3%，其次為其他 3 個 Potyvirus 病毒群的 PVY、ChiVMV 和 PepMoV，感染比例都在 20%以上，CMV 感染比例為 14.4%，Tobamovirus 病毒群的 3 個 virus 感染率合計達 10.4%，粉蝨傳播的 TYLCV 感染比例為 8.7%，薊馬傳播的 CaCV 感染比例為 5.9%，未檢測到上述病毒者 174 個樣本，佔 18.8%。

台灣甜椒栽培方式有設施栽培和露天栽培，檢視甜椒樣本採集來源，樣本採集自露天栽培甜椒者，病毒發病率介於 2-10%之間，樣本採集自露

天栽培田區，各病毒檢出率差異不大，介於 6.0-10.5%之間。設施栽培者，Potyvirus 的檢出率遠高於其他病毒，且出現病毒病徵植株常呈現區塊存在，推測可能去芽或採果時，刀具等造成病毒傳播。

表一、自2007至2010番椒病毒病害發生概況調查

Table 1. Investigation of the virus diseases on pepper from 2007 to 2010

	TMV ToMV PMMoV	CMV	CaCV	PVY	PVMV	ChiVMV	PepMoV	ToLCV TYLCV	ND	Total
2007	15 9.7%	3 1.9%	20 12.9%	44 28.4%	53 34.2%	46 29.7%	21 13.5%	14 9.0%	36 23.2%	155
2008	20 7.7%	33 12.5%	15 5.7%	56 21.1%	76 28.7%	62 23.4%	51 19.2%	18 6.8%	46 17.3%	265
2009	31 10.1%	52 16.9%	13 4.2%	62 20.1%	94 30.5%	69 22.4%	73 23.7%	37 12.0%	53 17.2%	308
2010	30 15.4%	45 23.1%	6 3.1%	50 25.6%	57 29.2%	43 22.1%	46 23.6%	11 5.6%	39 20.2%	195
Total	96 10.4%	133 14.4%	54 5.9%	212 23.0%	280 30.3%	220 23.8%	191 20.7%	80 8.7%	174 18.8%	923

相較於甜椒，辣椒多為露天栽培。傳統上認為辣椒對病毒具有較高的抗（耐）病性，因此栽培上較為粗放，一但栽培不抗病毒的品種，很容易造成很高的病毒感染率，幾乎全園罹病。檢測的辣椒樣本中，多為 CMV 和 potyviruses 複合感染，比例高達 80.5%。

在番茄上危害嚴重的 TYLCV，在番椒上為潛伏感染，幾乎不表現病徵。在測到的樣本中，幾乎都與其他病毒複合感染，感染比例也不高，僅佔樣本 12%以下，估計其在田間僅為零星發生。在檢測的辣椒樣本中，到目前為止尚未測到 TYLCV 感染。

目前檢測的甜椒樣本中，98 年仁愛地區高冷地夏季種植甜椒約有一半栽培面積，栽培一個月左右的甜椒即有超過十分之一的植株發病，罹病株上位葉黃化，有壞疽斑，接著引起植株萎凋，與前述病毒病徵不同，經初步診斷由蕃茄斑萎病毒引起。調查高冷地栽培的南投縣仁愛鄉、信義鄉與秋冬季栽培為主的南投縣埔里鎮、嘉義縣、雲林縣、台東縣等地甜椒感染

TSWV 情形，結果如表二。僅 98 年在仁愛鄉採集 205 個甜椒和辣椒樣本，測到 TSWV 感染比例達 86.8%，信義鄉僅有零星發生，農友經常在發現病株時即加以拔除，計算缺株估計發生率低於 3%，採集樣本 36 個，TSWV 感染比例為 36.1%，南投縣埔里鎮、嘉義縣、雲林縣、台東縣測到 TSWV 的比例都很低，介於 0-4.6%之間。99 年度在測高冷地種植甜椒，仁愛鄉感染比率只佔田區 5%以下，採集樣本檢出率降至 32%，信義鄉則未測到 TSWV。比較 98 至 99 年仁愛鄉 TSWV 感染比率下降，可能因為今年午後降雨增多，加上鑑於 98 年經驗，農友加強媒介昆蟲薊馬防治，降低 TSWV 感染率。比較仁愛、信義二鄉種植甜椒 TSWV 感染率差別甚大，推測信義鄉的設施栽培有效降低病毒的發生。同樣的狀況也發生在 98 年度仁愛鄉的番茄，栽培區域與甜椒重疊，但因番茄多為設施栽培，受到 TSWV 危害並不嚴重，也只有零星發生。實驗中雖然也調查薊馬的帶毒率，但因帶毒率與實際傳毒能力並不相關，實際上的傳毒種薊馬種類仍需進一步進行傳毒試驗證實。

表二、98-99年間TSWV感染番椒作物之調查

Table 2. Investigation of the diseases caused by TSWV on pepper from 2009

	Nantou County			Youlin county	Chiayi county	Taidong County
	Puli	Renai	Sinyi			
2009	4/70	178/205 86.8%	13/36 36.1%	3/65 4.6%	0/45 0%	0/32 0%
2010	0/32 0%	40/125 32.0%	0/43 0%	ND	ND	ND

番椒病毒病的防治

防治病毒病害最有效的方法為選用抗病品種，如前述目前已有許多商品化的抗病品種可供選擇，的確可以有效控制病毒發生，使 TMV、CMV 和 PVY 發生率降低至不危害經濟效益範圍。但農民有時會取高產量等園藝性狀而捨抗病性，使病毒病害大量發生，98 年 TSWV 侵襲仁愛鄉甜椒即是一例[34]。

圖一、病毒感染甜椒的葉部病徵。（A）番椒葉脈斑駁病毒感染之病徵；（B）番茄斑萎病毒病毒感染之病徵。

Fig. 1. Symptoms caused by virus on sweet pepper leaves. (A) Symptoms caused by *Pepper veinal mottle virus*. (B)*Tomato spotted wilt virus* as the causal agent.

選用健康種苗、避免機械傳播、發現病株及早拔除也是防止病毒擴散的重要方法，感染番椒的 10 種病毒中，除了 TYLCV 之外，其他病毒均可經由機械傳播，尤其番椒生長期長，需要修剪整枝，又為連續採收的作物，田間調查的結果發現感染此類病毒大都是藉由農友在整枝、摘除側芽時的機械傳播，一植行中若有一、兩株罹病，藉整枝摘芽就可迅速傳播開。另外，抗 PVY 品種也常對其他 potyviruses 提供抗（耐）病性[28]，使病徵趨於輕微，農民不以為意而造成病毒在網室內擴散。

防治媒介昆蟲如蚜蟲、薊馬及銀葉粉蝨，且須由苗期開始防治。番椒屬於週年可栽培的作物，田間寄主、茄科雜草與媒介昆蟲周年不間斷，蚜蟲及銀葉粉蝨在乾燥的氣候蟲口密度不斷增加，病毒病害危害猖獗。台灣自 1991 年在番茄[21]及西瓜[33]發現 tospoviruses 以來，已有許多作物遭受不同病毒感染[17]。尤其 TSWV 寄主範圍廣泛[9, 10]，已在可感染 90 科雙子葉植物，8 科單子葉植物，包含菊科 213 種，豆科 50 種和茄科 168 種植物，可以媒介傳播 Tospovirus 的薊馬在台灣有台灣花薊馬、蔥薊馬、南黃薊馬、小黃薊馬及梳缺花薊馬等 5 種，前 4 種為蔬菜、瓜果類及果樹上重要的害蟲，梳缺花薊馬在田間的發生密度不高[3]。TYLCV 雖然寄主範圍較窄，但其媒介昆蟲銀葉粉蝨(Bemisia argentifolii)食性雜，危害作物已超過 500 多種，本蟲體型小，世代短，一年可發生十幾代，繁殖快，且抗藥性也強。銀葉粉蝨喜棲息於日照不足，密植或繁茂不通風之作物葉背上取食或產卵，母蟲一生產卵達 200-400 粒，管理稍一不慎，密度常一發不可收拾[1,4]，其媒介的 Begomovirus 已對台灣番茄生產造成極大的危害。

監測新病毒的發生亦甚為重要，PVMV 和 PepMoV 可能已在台灣發生多年，除了 PVMV 與 ChiVMV 具血清相關性外[22, 26]，也因與 ChiVMV 複合感染而未被測出。 98 年新發生的 TSWV 和 TYLCV 未來對番椒生產的影響，值得密切注意。另外，嚴重危害印尼番椒作物的 Pepper yellow leaf curl virus[29]與東南亞另有感染番椒的 potyviruses[6,14,19,24]，是否存在台灣，會否影響全台其他作物，也應密切注意。

引用文獻

1. 林鳳琪. 2007. 銀葉粉蝨傳播之植物病毒病害及其防治策略. 2007植物蟲媒病害與防治研討會. 96 年10 月26 日. 國立中興大學. pp247-256.
2. 郭孚耀. 2000. 甜椒栽培技術. 台中區農業改良場. 66pp.
3. 黃莉欣、蘇文瀛. 2007. 薊馬在 Tospovirus 病害上的角色及其防治. 2007植物蟲媒病害與防治研討會. 96 年10 月26 日. 國立中興大學. pp83-100.
4. 陳文雄、張煥英. 1997. 銀葉粉蝨之生態與防治. 台南區農業改良場技術專刊 86-1. pp6.
5. 陳文雄、鄭安秀、林義雄、陳紹崇. 1997. 番椒病蟲害防治. 台南區農業改良場技術專刊86-6. pp10.
6. Ahn H. I., Yoon J. Y., Hong J. S. 2006. The complete genome sequence of *Pepper severe mosaic virus* and comparison with other potyviruses. Archives of Virology 152, 2037– 2045.
7. Agranovsky, A. A. 1993. Virus diseases of pepper (*Capsicum annuum* L.) in Ethiopia. Journal of Phytopathology 138, 89–97.
8. Berzal-Herranz, A., Cruz, Tenllado, A. de la F., Diaz-Ruiz, J. R., Lopez, L., Sanz, A.I., Vaquero, C., Serra, M. T., and Garcia-Luque, I. 1995. The Capsicum L3 gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein. Virology 209: 498–505.
9. Best, R. J. 1968. Tomato spotted wilt virus. Adv. Virus Res. 13: 65-146.
10. Best, R. J., and Hariharsubramanian, V. 1967. Serological studies on tomato spotted wilt virus (strain E and RI). Enzymologia 32: 128-134.
11. Boiteux, L. S, Nagata, T, Dutra, W. P. and Fonseca, M. E. N. 1993. Sources of resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) in cultivated and wild species of *Capsicum*. Euphytica 67: 89-94.
12. Brommonschenkel, S. H., Frary, A., Frary, A., and Tanksley, S. D. 2000. The broad-spectrum tospovirus resistance gene Sw-5 of tomato is a

homolog of the root-knot nematode resistance gene Mi. Mol. Plant Microbe Interact. 13: 1130–1138.

13. Brunt, A. A., Kenten, R. H. 1971. Pepper veinal mottle virus: a new member of the potato Y group from peppers (*Capsicum annuum* L. and *C. frutescens* L.) in Ghana. Annals of Applied Biology 69: 235–243.
14. Chiemsombat, P., Sae-Ung, N., Attathom, S., Patarapuwadol, S., Siriwong, P. 1998. Molecular taxonomy of a new potyvirus isolated from chilli pepper in Thailand. Archives of Virology 143, 1855–1863.
15. Cheng, Y. H., Wang, R. Y., Chen, C. C., Chang, C. A. and Jan, F.-J. 2009. First report of Pepper veinal mottle virus in tomato and pepper in Taiwan. Plant Disease 93:107.
16. Cheng, S. S., Green, S. K., Griggs, T. D., and McLean, B. T. 1989. The use of *Capsicum chinense* as sweet pepper cultivars and sources for gene transfer. In:Tomato and Pepper Production in the Tropics. Proceedings of the international symposium on integrated management practices, Tainan, Taiwan, 21-26 March 1988. AVRDC Publication No. 89-317: 55-62.
17. Chu, F. H., Chao, C. H., Chung, M. H., Chen, C. C., and Yeh, S. D. 2001. Completion of the genome sequence of watermelon silver mottle virus and utilization of degenerate primers for detection tospoviruses in five serogroups. Phytopathology 91: 361-368.
18. Clark, M. F., and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34, 475–483.
19. Feldman, J. M., and Gracia, O. 1977. Pepper severe mosaic virus: a new potyvirus from pepper in Argentina. Journal of Phytopathology 89, 146–160.

20. Green, S. K., and Kim, J. S. 1991. *Characteristics and Control of Viruses Infecting Peppers: a Literature Review*. Tainan, Taiwan: Asian Vegetable Research and Development Center: Technical Bulletin No. 18.
21. Green, S., and Chou, J. C. 1991. Identification of the watermelon isolate of tomato spotted wilt virus from tomato in Taiwan. Plant Prot. Bull. 33: 424.
22. Green, S. K., Hiskias, Y., Lesemann, D.E., and Vetten, H. J. 1999. Characterization of *Chilli veinal mottle virus* as a potyvirus distinct from Pepper veinal mottle virus. Petria 9: 332.
23. Holmes, F. O. 1958. A single-gene resistance test for viral relationship as applied to strains of spotted wilt virus. Virology 5: 382-390.
24. Inoue-Nagata, A, Fonseca, M. E. .N, and Resende, R.O. 2002. *Pepper yellow mosaic virus*, a new potyvirus in sweet pepper, *Capsicum annuum*. Archives of Virology 147: 849–855.
25. Jan, F. J., Green, S. K., Shih, S. L., Lee, L. M., Ito, H., Kimbara, J., Hosoi, K., and. Tsai, W. S. 2007. First report of Tomato yellow leaf curl Thailand virus in Taiwan. Plant Disease 91: 1363.
26. Moury B, Palloix A, Caranta C, Gognalons P, 2005. Serological, molecular, and pathotype diversity of *Pepper veinal mottle virus* and *Chili veinal mottle virus*. *Phytopathology* **95**, 227–232.
27. Pochard,. E. 1977. Methods for the study of partial resistance to cucumber mosaic virus in pepper. Capsicum 77, Proc 3rd EUCARPIA Meeting, Avignon-Montfavet, France, pp 93-104.
28. Provvidenti, R. and Hampton, R.O. 1992. Sources of resistance to viruses in the Potyviridae. Arch. Virol. 5: 189–211.
29. Shih, S. L.. Tsai, W. S., Lee, L. M., Wang, J. T., Green, S. K., and Kenyon, L. 2010. First Report of *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* Associated with Pepper Leaf Curl Disease in Taiwan. Plant Disease 94**:** 637.

30. Tsai, W. S., Jan, F. J., Huang, Y. C., and Green, S. K. 2005. Molecular characterization of five strains of chilli veinal mottle virus (ChiVMV) in Taiwan. Plant Protection Bulletin 47:429-430.
31. Whitham, S. A., Anderberg, R. J., Chisholm, S. T., and Carrington, J. C. 2000. Arabidopsis RTM2 gene is necessary for specific restriction of tobacco etch virus and encodes an unusual small heat shock-like protein. Plant Cell 12: 569–582.
32. Whitham, S., Dinesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., and Baker, B. 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and interleukin-1 receptor. Cell 78: 1011–1015.
33. Yeh, S, D., Lin, Y, C., Cheng, Y, H., Jih, C. L., Chen, M. J., and Chen, C. C. 1992. Identification of tomato spotted wilt-like virus infecting watermelon in Taiwan. Plant Disease. 76: 835-840.
34. Zheng, Y.-X., Huang, C.-H., Cheng, Y.-H., Kuo, F.-Y., and Jan, F.-J. 2010 First Report of *Tomato spotted wilt virus* in Sweet Pepper in Taiwan. Plant Disease 94: 920.

ABSTRACT

Investigation of the virus diseases on pepper in Taiwan

Cheng, Y. H.[1,4], Chen, C. C. [1], Liao, J. Y. [1], Deng, T. C. [1],
Lin, F. C. [2], and Jan, F. J.[3]

[1] Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Thaichung, Wu-feng 413, Taiwan, R.O.C.

[2] Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Thaichung, Wu-feng 413, Taiwan, R.O.C.

[3] Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, R.O.C.)

[4] Corresponding author, Email:YHcheng@tari.gov.tw

Pepper (Capsicum annuum L., C. frutescens L.) is divided into sweet pepper and chili pepper, as an important vegetable crops. There are 11 species of viruses infecting pepper in Taiwan. Pepper samples showed symptoms could be caused by virus were collected for analysis with ELISA and polymerase chain reaction (PCR). The virus infection rate of sweet pepper collected from open field is insignificant, ranging from 6.0-10.5% respectively. The infection rate of potyviruses in sweet pepper is much higher than other viruses if samples collected from net house. In chili pepper, the infection rate of CMV is the highest and 80.5% of samples showed co-infection with potyviruses. Since abnormal rainfall distribution of global warming, the population of virus vector may be increased and caused serious diseases. A severe disease on pepper plants showing chlorosis, necrosis and die back were observed in Renai Township in 2009. The causal agent is TSWV, a thrip transmitted tospovirus. The infection rate is higher than 30% but dropped to lower than 5% till 2010. In this survey, TYLCV, the whitefly transmitted virus does not show high infection rate in pepper. Since TYLCV caused dramatic losses in tomato, its influence in pepper production should pay more attention.

Key words：pepper, virus, thrip, whitefly

國家圖書館出版品預行編目資料

近年來我國重大作物病害之發生及其診斷、監測與防治研討會專刊 / 蔡志濃等編輯. -- 臺中縣霧峰鄉：農委會農試所, 民 99. 12
面: 18.7*26 公分 -(農業試驗所特；第 149 號)

ISBN 978-986-02-6217-9 (平裝)

1. 植物病蟲害 2. 農作物

433.4 99024888

「近年來我國重大作物病害之發生及其診斷、監測與防治」研討會專刊

編　　輯：蔡志濃、陳金枝、蔡佳欣、安寶貞
出 版 者：行政院農業委員會農業試驗所
地　址：台中縣霧峰鄉中正路 189 號
網　址：http://www.tari.gov.tw
印 製 者：農世股份有限公司
定　　價：平裝 新台幣 350 元
出版日期：中華民國九十九年十二月　初版
展 售 處：國家書店松江門市
台北市松江路三段 209 號 TEL:02-25180207
五南文化廣場
台中市中山路 2 號 TEL:04-22260330
國家網路書店：http://www.govbooks.com.tw
ISBN：978-986-02-6217-9 (平裝)
GPN：1009904516

—版權所有　翻印必究—

「近年來我國重大作物病害之發生及其診斷、監測與防治」研討會專刊

蔡志濃、陳金枝、蔡佳欣、安寶貞 主編

ISBN 978-986026217-9

9 789860 262179

GPN: 1009904516